

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA LUCIA VIEIRA MION**

**TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA COM MESILATO DE  
IMATINIBE – PERFIL DA RESPOSTA MOLECULAR EM PACIENTES BRASILEIROS**

**CURITIBA**

**2014**

**ANA LUCIA VIEIRA MION**

**TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA COM MESILATO DE  
IMATINIBE – PERFIL DA RESPOSTA MOLECULAR EM PACIENTES BRASILEIROS**

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor em Medicina  
Interna, do Departamento de Clínica  
Médica do Setor de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Noemi Farah Pereira**

**CURITIBA**

**2014**

Mion, Ana Lúcia Vieira  
Tratamento da leucemia mieloide crônica com mesilato de imatinibe – perfil da  
resposta molecular em pacientes brasileiros / Ana Lúcia Vieira Mion. -- Curitiba,  
2014.

71 f.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Noemi Farah Pereira

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor  
de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Leucemia Mielogênica Crônica BCR-ABL Positiva. 2. Reação em Cadeia da  
Polimerase em Tempo Real. 3. Proteínas Tirosina Quinases. 4. Cromossomo Filadélfia.  
I. Pasquini, Ricardo. II. Título.

NLM: WH 250



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA**  
**= MESTRADO e DOUTORADO =**

---

**PARECER**

Aos oito dias do mês de agosto do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: Dra. **Kátia Borgia Barbosa Pagnano**, Dra. **Sônia Mara Raboni**, Dr. **Nelson Spector**, Dr. **Israel Bendit** e Dr. **Ricardo Pasquini (Orientador)**, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **Ana Lúcia Vieira Mion** do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna nível Doutorado, da Universidade Federal do Paraná, intitulada: "TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA COM MESILATO DE IMATINIBE – PERFIL DA RESPOSTA MOLECULAR EM PACIENTES BRASILEIROS". A Banca examinadora considerou que **Ana Lúcia Vieira Mion**, apresentou trabalho adequado para Tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutora em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 08 de agosto de 2014.

Professora Dra. **Kátia Borgia Barbosa Pagnano**

Professora Dra. **Sônia Mara Raboni**

Professor Dr. **Israel Bendit**

Professor Dr. **Nelson Spector**

Professor Dr. **Ricardo Pasquini**

*À meus pais, Maria e Gervásio, em  
reconhecimento a grande dedicação e  
sacrifício em suas vidas, e por me mostrarem  
o caminho da honestidade e persistência.*

*Aos meus irmãos por todos os ótimos  
momentos partilhados.*

*Ao meu esposo e grande amigo, Marcelo, por  
todo amor, compreensão e paciência no  
decorrer de nossa jornada.*

*À minha filha, Isabela, por dar significado a  
minha existência e torná-la mais feliz.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Pasquini, pela oportunidade de ser sua orientanda e, poder desfrutar de sua valiosa condução no desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Meu respeito e admiração pela sua sabedoria, seu espírito empreendedor, sua ética e eficiência que garantem o benefício de inúmeros pacientes e contribui com a formação de um grande número de profissionais.

À Dr.<sup>a</sup> Noemi Farah Pereira pelo incentivo em minha vida profissional. Meu reconhecimento por sua determinação, eficiência e por seu valioso apoio na condução deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Vaneuza A. M. Funke por seu empenho e entusiasmo na criação do Ambulatório de Leucemia Mieloide Crônica do HC-UFPR, pelo carinho e competência demonstrados com todos os seus pacientes e também, por suas contribuições durante a execução deste estudo.

Aos pacientes, meu especial agradecimento, pois sem vocês este trabalho não poderia ser realizado.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética por todo apoio e incentivo recebidos. Em especial à equipe do Setor de Biologia Molecular das Doenças Onco-Hematológicas: Araci Fagundes, Jorge Novaes, Julliany Kuceki, Luciane Kaminski, Priscilla Smaniotto e Vanessa Kukla que temporariamente assumiram minhas funções permitindo a realização deste trabalho.

Ao coordenador da Pós-Graduação em Medicina Interna da UFPR, Prof. Dr. Hélio Teive, pela oportunidade concedida para a realização deste estudo.

À Lúcia Lemiska e Valéria A. Knapp, secretárias da Pós-Graduação em Medicina Interna da UFPR, por todo auxílio no decorrer desta jornada.

À Heliz Regina Neves, por seu pronto auxílio na área de Informática.

Às empresas, Novartis Biociências S.A. e Bristol Myers Squibb Farmacêutica S.A., pelo suporte financeiro para a realização dos exames laboratoriais.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este sonho se transformasse em realidade.

## RESUMO

**Introdução:** A introdução do mesilato de imatinibe revolucionou o tratamento da leucemia mieloide determinando expressiva redução dos níveis sanguíneos de *BCR-ABL1*. A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (Q-PCR) é o método que permite a identificação precoce de pacientes que são bons respondedores e daqueles que não irão apresentar resposta adequada e poderão se beneficiar com mudanças na estratégia de tratamento. **Objetivo:** Avaliar a resposta ao tratamento com imatinibe 400 mg/dia em pacientes brasileiros portadores de leucemia mieloide crônica (LMC) em fase crônica (FC) e monitorados por meio da Q-PCR para quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*. **Material:** 3.169 amostras de sangue periférico, de 1.403 pacientes, coletadas entre três e cinco meses, seis e 11 meses, 12 e 17 meses, 18 e 23 meses e no período  $\geq 24$  meses após o início do tratamento com imatinibe. **Método:** A quantificação dos transcritos *BCR-ABL1* foi realizada pela Q-PCR usando-se sonda de hidrólise TaqMan™ e o gene *ABL1* como controle. Os resultados da razão *BCR-ABL1/ABL1*, em porcentagem, foram expressos em escala internacional (EI) usando-se o fator de conversão (0,51) do Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR. **Resultados:** No período de três a cinco meses a resposta ótima ao tratamento ( $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ ) foi alcançada por 80,8% (274/339) dos pacientes. Enquanto no intervalo de seis a 11 meses, 69,1% (397/574) atingiram a resposta ótima com a redução de pelo menos 2 logs ( $BCR-ABL1^{EI} \leq 1\%$ ). E entre 12 e 17 meses, 47,3% (297/628) dos pacientes alcançaram a resposta molecular maior (RMM) que corresponde à quantificação  $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$ . Este mesmo patamar de resposta foi alcançado por 57,8% (350/606) entre 18 e 23 meses e por 61,8% (631/1.022) no período  $\geq 24$  meses. Dentre os 1.403 pacientes, 82 tinham amostras disponíveis e analisadas em todos os intervalos de tempo. Para estes, no período de três a cinco meses, 78,1% (64/82) alcançaram quantificação  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ . Entre seis e 11 meses, 67% (55/82) obtiveram a redução de no mínimo 2 logs. Para o intervalo entre 12 e 17 meses, 45,1% (37/82) alcançaram a RMM. Este mesmo patamar de resposta foi atingido por 63,4% (52/82) no período de 18 a 23 meses e, por 71,9% (59/82) no último intervalo de tempo. **Conclusões:** Os resultados deste estudo retrospectivo com amostras encaminhadas para análise quantitativa sugerem que o perfil da resposta dos pacientes brasileiros portadores de LMC-FC em uso de imatinibe 400 mg/dia se encontra dentro do esperado quando comparado ao perfil da resposta dos pacientes reportados em estudos internacionais prospectivos e randomizados. Além disto, o presente estudo mostra que pacientes monitorados sequencialmente possuem resultados melhores do que aqueles sem avaliações em todos os intervalos de tempo.

**Palavras-chave:** Leucemia Mielogênica Crônica BCR-ABL positiva. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Proteínas Tirosina Quinases. Cromossomo Filadelfia.

## ABSTRACT

**Background:** The introduction of imatinib mesylate has revolutionized the treatment of myeloid leukemia causing significant reduction in blood levels of *BCR - ABL1*. Real Time Quantitative PCR (Q-PCR) is the method that allows the early identification of patients who are good responders, and those who will not show adequate response and may benefit from changes in the treatment strategy. **Objective:** To evaluate the response to treatment with imatinib 400 mg/day in Brazilian patients with chronic myeloid leukemia (CML) in chronic phase (CP) monitored by Q-PCR for quantification of transcripts of the *BCR-ABL1* fusion gene. **Material:** 3,169 peripheral blood samples of 1,403 patients undergoing treatment with imatinib and collected between 3 and 5 months, 6 and 11 months, 12 and 17 months, 18 and 23 months and  $\geq 24$  months after the beginning of imatinib treatment. **Method:** *BCR-ABL1* quantification was performed by Q-PCR using TaqMan system and *ABL1* as the control gene. Results of *BCR-ABL1/ABL1* ratio, in percentage, were reported in the international scale (IS) using the conversion factor (0.51) for the Immunogenetics Laboratory, HC-UFPR. **Results:** In the period between 3 to 5 months after the initiation of treatment the optimal response (*BCR - ABL1*<sup>IS</sup>  $\leq 10\%$ ) was achieved by 80.8% (274/339) of patients. In the 6 to 11 months interval 69.1% (397/574) reached optimal response with the reduction of at least 2 logs (*BCR - ABL1*<sup>IS</sup>  $\leq 1\%$ ). Between 12 and 17 months, 47.3% (297/628) of patients achieved major molecular response (MMR) that corresponds to *BCR-ABL1*<sup>IS</sup> quantification  $\leq 0.1\%$ . The same level of response was reached by 57.8% (350/606) of patients between 18 and 23 months, and by 61.8% (631/1,022) in the period  $\geq 24$  months. Of 1,403 patients, 82 had samples that were analyzed for all time periods. In this latter group, 78.1% (64/82) achieved *BCR - ABL1*<sup>IS</sup>  $\leq 10\%$  in the period between 3 and 5 months and 67% (55/82) of patients reached 2 logs reduction in the 6 to 11 months interval. In the period from 12 to 17 months, 45.1% (37/82) achieved MMR. This same level of response was reached by 63.4% (52/82) of patients in the period from 18 to 23 months, and by 71.9% (59/82) of patients in the last time interval. **Conclusions:** The results of this retrospective study, using samples referred for quantitative analysis, show that the response profile of Brazilian patients with CML-CP with a dose of 400 mg/day of imatinib is within the expected profile when compared to the response of the patients reported in international prospective and randomized studies. The present study also shows that patients who had sequential monitoring have better results than those without monitoring at all time intervals.

**Keywords:** Chronic myeloid leucemia. Real-time Polymerase Chain Reaction. Protein-Tyrosina Kinases. Philadelphia Chromosome.



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - DEFINIÇÃO DE RESPOSTA HEMATOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE ACORDO COM O <i>EUROPEAN</i> <i>LEUKEMIA NETWORK</i> .....	24
QUADRO 2 - DEFINIÇÃO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE DE ACORDO COM O <i>EUROPEAN</i> <i>LEUKEMIA NETWORK</i> .....	26
QUADRO 3 - RECOMENDAÇÕES PARA ANÁLISES LABORATORIAIS.....	26

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS DOS 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI .....	39
TABELA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DE ACORDO COM O TEMPO (MESES) DE TRATAMENTO COM MI.....	39
TABELA 3 -	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS POR PACIENTE...	39
TABELA 4 -	RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI. ESSA ANÁLISE INCLUI AS 3.169 AMOSTRAS DISTRIBUÍDAS EM CINCO PERÍODOS DE TEMPO.....	40
TABELA 5 -	RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ .....	42
TABELA 6 -	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DOS GRUPOS A E B DE ACORDO COM O TEMPO (MESES) DE TRATAMENTO COM MI .....	43
TABELA 7 -	PERFIL DA RESPOSTA DOS 1.403 PACIENTES DISTRIBUÍDOS NOS GRUPOS A E B.....	44
TABELA 8 -	PERFIL DA RESPOSTA NOS GRUPOS A E B PARA AMOSTRAS COM QUANTIFICAÇÃO $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ .....	47
TABELA 9 -	PERFIL DA RESPOSTA DOS 1.403 PACIENTES DISTRIBUÍDOS NOS GRUPOS C E D .....	50
TABELA 10 -	PERFIL DA RESPOSTA PARA OS GRUPOS C E D PARA AMOSTRAS COM QUANTIFICAÇÃO $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ .....	52

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	CARIÓTIPO COM AS SETAS EVIDENCIANDO O CROMOSSOMO Ph E O SEU DERIVATIVO 9q+ .....	14
FIGURA 2 -	REGULAÇÃO DA ATIVIDADE TIROSINA QUINASE NAS PROTEÍNAS Abl1 E p210 <sup>Bcr-Abl1</sup> .....	15
FIGURA 3 -	FORMAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO FILADELFIA ORIGINANDO O GENE DE FUSÃO <i>BCR-ABL1</i> E SEUS TRANSCRITOS DE RNAm (e13a2 E e14a2) QUE CODIFICAM A PROTEÍNA p210 <sup>Bcr-Abl1</sup> .....	16
FIGURA 4 -	VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ATIVADAS PELA PROTEÍNA Bcr-Abl1 .....	18
FIGURA 5 -	HISTÓRICO DO TRATAMENTO EM LMC .....	21
FIGURA 6 -	MECANISMO DE AÇÃO DO MESILATO DE IMATINIBE.....	22
GRÁFICO 1 -	PERFIL DA RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI .....	41
GRÁFICO 2 -	PERFIL DA RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO <i>BCR-ABL1</i> <sup>El</sup> ≤ 10%.....	42
GRÁFICO 3 -	PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.488 AMOSTRAS INCLUÍDAS NO GRUPO A E ORIUNDAS DE CINCO CENTROS .....	45
GRÁFICO 4 -	PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.681 AMOSTRAS INCLUÍDAS NO GRUPO B E ORIUNDAS DE 21 CENTROS ....	46
GRÁFICO 5 -	PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.488 AMOSTRAS DO GRUPO A COM QUANTIFICAÇÃO <i>BCR-ABL1</i> <sup>El</sup> ≤ 10% .....	48
GRÁFICO 6 -	PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.681 AMOSTRAS DO GRUPO B COM QUANTIFICAÇÃO <i>BCR-ABL1</i> <sup>El</sup> ≤ 10%.....	48
GRÁFICO 7 -	PERFIL DA RESPOSTA DE 82 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI.....	51
GRÁFICO 8 -	PERFIL DA RESPOSTA DE 1.321 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI .....	51

GRÁFICO 9 - PERFIL DA RESPOSTA DE 82 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ .....	53
GRÁFICO 10 - PERFIL DA RESPOSTA DE 1.321 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ .....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>ABL1</i>	- Gene humano homólogo ao gene Abelson do vírus da leucemia murina
ARA-C	- Citarabina
ATP	- Adenosina trifosfato
<i>BCR</i>	- Gene <i>breakpoint cluster region</i>
BI	- Linha de base internacional
BL	- Linha de base laboratorial
CB	- Crise blástica
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
DNAC	- Ácido desoxiribonucleico complementar
EI	- Escala internacional
ELN	- <i>European leukemia network</i>
EUTOS	- <i>European treatment outcome study</i>
FA	- Fase acelerada
FC	- Fase crônica
Fc	- Fator de conversão
FISH	- Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
INF- $\alpha$	- Interferon $\alpha$
IRIS	- <i>International randomized study of interferon versus STI571</i>
ITQ	- Inibidor da tirosina quinase
LLA	- Leucemia Linfóide Aguda
LMA	- Leucemia Mieloide Aguda
LMC	- Leucemia Mieloide Crônica
M-BCR	- <i>Major breakpoint cluster region</i>
m-BCR	- <i>Minor breakpoint cluster region</i>
MI	- Mesilato de imatinibe
NES	- Sinais para exportação nuclear
NLS	- Sinais para localização nuclear
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
Ph	- Cromossomo Filadelfia

Q-PCR	- Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RCC	- Resposta citogenética completa
RHC	- Resposta hematológica completa
RMC	- Resposta molecular completa
RMM	- Resposta molecular maior
RMP	- Resposta molecular profunda
RNA <sub>m</sub>	- Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	- Reação de transcrição reversa
SG	- Sobrevida global
SH	- Domínios com homologia Src
SLE	- Sobrevida livre de eventos
SLP	- Sobrevida livre de progressão
TCTH	- Transplante de células tronco-hematopoéticas
UHHO	- Unidade de Hematologia, Hemoterapia e Oncologia
WHO	- <i>World Health Organization</i>
μ-BCR	- <i>Micro breakpoint cluster region</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 ASPECTOS GERAIS	13
1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PROTEÍNA Bcr-Abl1	15
1.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELA Bcr-Abl1	18
1.4 FASES DA LMC	19
1.5 TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA	20
1.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LMC	23
1.7 HARMONIZAÇÃO DOS RESULTADOS MOLECULARES EM ESCALA INTERNACIONAL	27
1.8 RESULTADOS DOS PRINCIPAIS ESTUDOS COM MI	28
<b>2 OBJETIVOS</b>	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	34
3.1 CASUÍSTICA	34
3.2 MÉTODOS	36
3.2.1 Estabilização e extração do RNA	36
3.2.2 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)	36
3.2.3 Identificação do tipo de transcrito do gene <i>BCR-ABL1</i>	36
3.2.4 Quantificação dos transcritos do gene <i>BCR-ABL1</i>	37
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
<b>4 RESULTADOS</b>	39
<b>5 DISCUSSÃO</b>	54
<b>6 CONCLUSÕES</b>	59
<b>REFERÊNCIAS</b>	60
<b>ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	70

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS GERAIS

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma expansão clonal da célula progenitora hematopoética que resulta em hiperplasia mieloide, leucocitose, neutrofilia, basofilia e esplenomegalia (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007; BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008; FUNKE; PASQUINI, 2013). Essa doença representa aproximadamente 15% de todas as novas leucemias diagnosticadas em adultos (LEITNER; HOCHHAUS; MULLER, 2011).

A incidência da LMC varia de 1 a 2 casos/100.000 pessoas ao ano, predominantemente entre a quinta e sexta décadas de vida, sendo rara em crianças (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007; PERROTTI *et al.*, 2010). Em alguns países em desenvolvimento, como o Brasil, os levantamentos apontam para uma diminuição na idade de incidência da LMC (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008). Existe uma discreta predominância da doença em indivíduos do sexo masculino, sendo a proporção de 1,2–2,1 casos em homens para um caso em mulheres (FUNKE *et al.*, 2005; DE LAVALLADE *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2010; LEITNER; HOCHHAUS; MULLER, 2011).

O evento genético central que ocorre na LMC é a translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, t(9;22) (q34;q11), resultando na formação do cromossomo Filadelfia (Ph; 22q-) (Figura 1). As causas que ocasionariam essa translocação são ainda desconhecidas. A radiação ionizante foi postulada como agente causador desse evento devido ao aumento de LMC em sobreviventes japoneses após as bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007). Essa translocação origina um novo gene, *BCR-ABL1*, formado pela fusão do gene *ABL1* — o qual é o gene humano homólogo ao oncogene Abelson da leucemia murina (A-Mulv) - localizado no cromossomo 9, com o gene *breakpoint cluster region* (*BCR*), localizado no cromossomo 22 (FADERL *et al.*, 1999; PERROTTI *et al.*, 2010; JABBOUR; KANTARJIAN, 2012). Esse novo gene de fusão *BCR-ABL1* codifica uma oncoproteína que apresenta elevada atividade tirosina quinase e que é



responsável pela grande maioria dos efeitos clínicos na LMC (MELO *et al.*, 1993; FUNKE; PASQUINI, 2013).

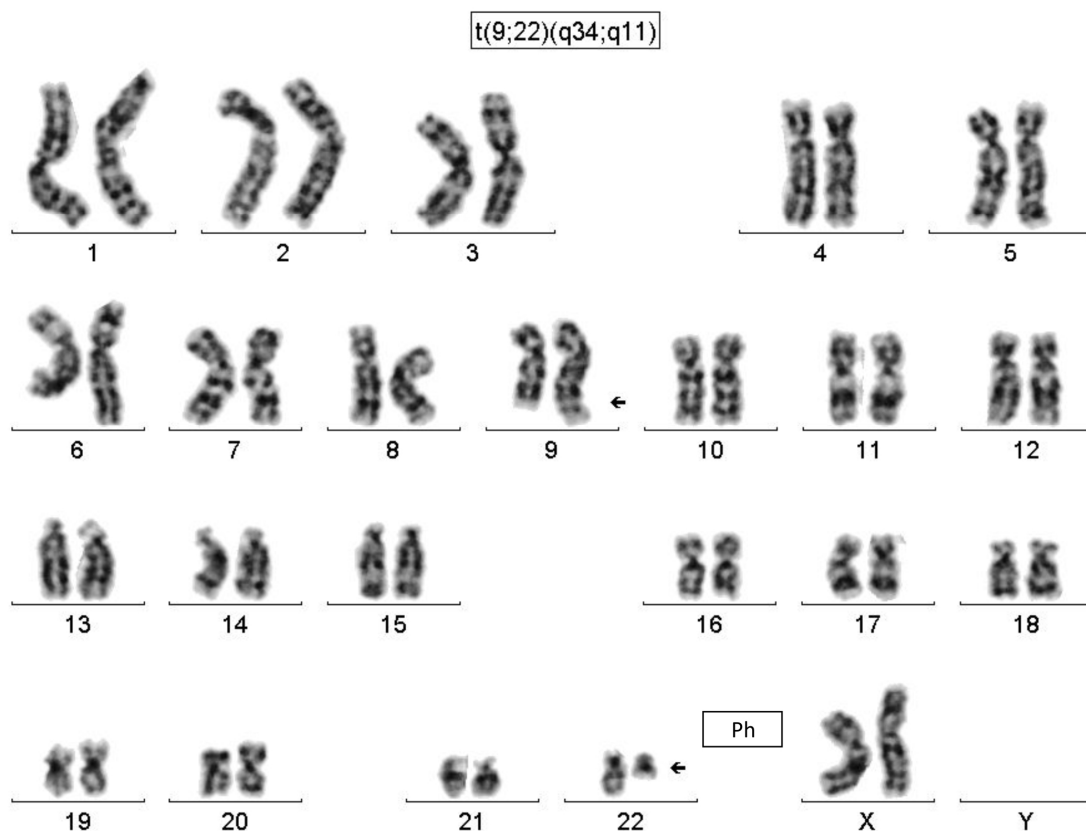


FIGURA 1 - CARIÓTIPO COM AS SETAS EVIDENCIANDO O CROMOSSOMO Ph E O SEU DERIVATIVO 9q+  
 FONTE: Laboratório de Citogenética. Unidade de Apoio Diagnóstico HC-UFPR.

A presença do cromossomo Ph em células de sangue periférico foi descoberta em 1960, por Nowell e Hungerford, e foi extremamente importante para a compreensão da fisiopatologia dessa doença, caracterizando-se como um marco divisório no estudo da biologia do câncer (GEARY, 2000; DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000). Estudos demonstraram que o cromossomo Ph origina-se em células tronco pluripotentes, pois ele é encontrado em células da linhagem granulocítica, eritroide, megacariocítica, linfóide B e, em menor proporção, em células da linhagem linfóide T (PASSEGUÉ *et al.*, 2003).

O cromossomo Ph está presente em aproximadamente 95% dos pacientes com LMC e, em menor proporção, nos pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (LLA), assim como em raros casos de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), linfoma e mieloma

(MELO, 1996). Esse cromossomo é, portanto, um marcador sensível para a doença e sua evolução (BRANDFORD; HUGHES; RUDZKI, 1999).

## 1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PROTEÍNA BCR-ABL1

A oncoproteína p210<sup>Bcr-Abl1</sup>, codificada pelo gene de fusão *BCR-ABL1*, possui localização citoplasmática (MELO, 1996). O evento da translocação desencadeia o seu potencial leucemogênico por ativar constitutivamente a atividade tirosina quinase (Figura 2) (GOLDMAN; MELO, 2003).

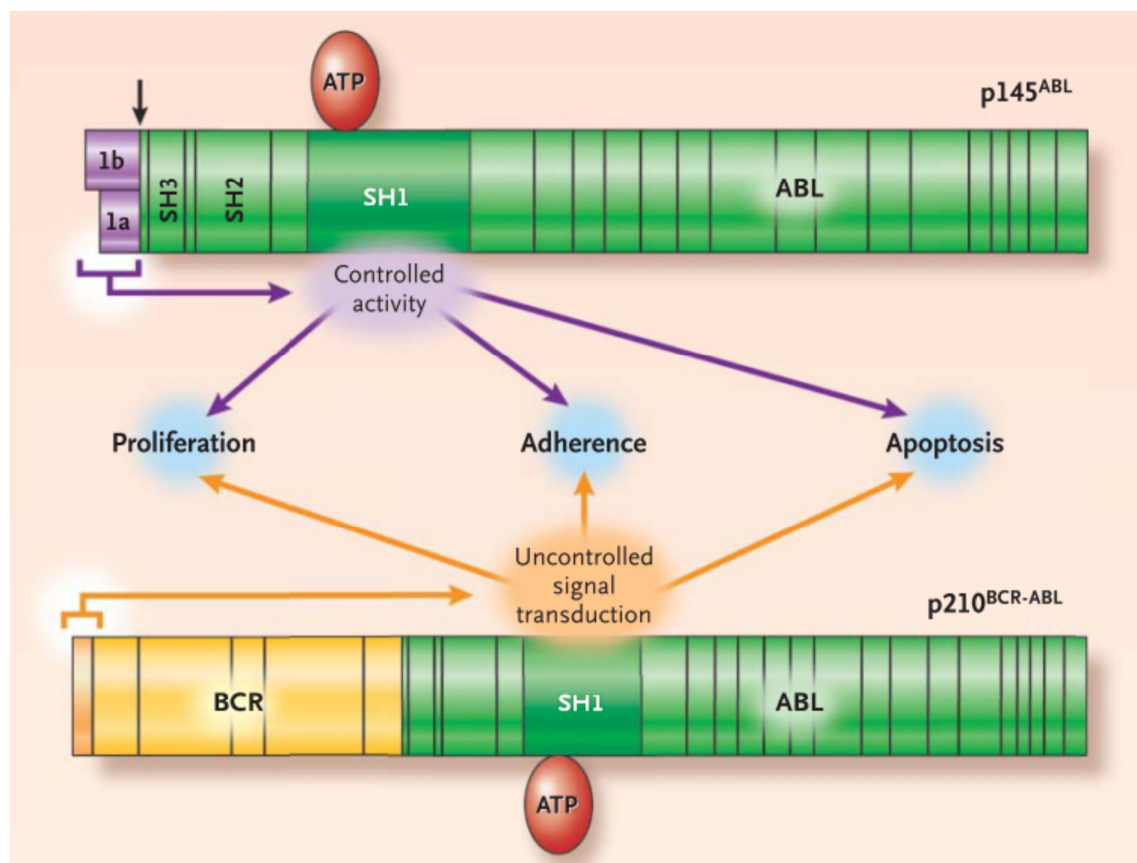


FIGURA 2 - REGULAÇÃO DA ATIVIDADE TIROSINA QUINASE NAS PROTEÍNAS Abl1 E p210<sup>Bcr-Abl1</sup>

FONTE: Goldman e Melo (2003)

NOTA: Na proteína Abl1 essa atividade é mantida sob controle devido à ação de ligações intramoleculares da porção aminoterminal, codificadas pelos exons alternativos 1a e 1b. Na proteína p210<sup>Bcr-Abl1</sup>, a perda dessa porção aminoterminal e o domínio de dimerização codificado pelo primeiro exon do gene *BCR* são responsáveis pela ativação da atividade tirosina quinase do domínio SH1, levando à ativação descontrolada de transdução de sinais e fenótipo celular alterado.

A proteína Abl1 normal é expressa em todos os tecidos (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000) e é uma proteína do tipo não receptor, com atividade tirosina quinase (MAURO; DRUKER, 2001; PRIETO-ECHAGÜE; MILLER, 2011) que flutua entre o núcleo e o citoplasma (GOLDMAN; MELO, 2003). A proteína Bcr normal apresenta maior expressão no cérebro e tecidos hematopoéticos, e interage com proteínas celulares envolvidas na sinalização intracelular, organização do citoesqueleto e desenvolvimento celular (LAURENT *et al.*, 2001). Na translocação, a quebra no gene *ABL1* ocorre normalmente entre os exons 1 e 2 e no gene *BCR*, para os casos clássicos de LMC, essa quebra ocorre na região *major breakpoint cluster region* (M-BCR), que engloba os exons 12 a 16 (historicamente b1 a b5) (MELO; DEININGER, 2004). Os ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm) transcritos a partir desse gene de fusão *BCR-ABL1* geralmente contêm uma das duas junções, e13a2 (b2a2) e e14a2 (b3a2), e codificam a proteína p210<sup>Bcr-Abl1</sup> (Figura 3) (GOLDMAN; MELO, 2003).

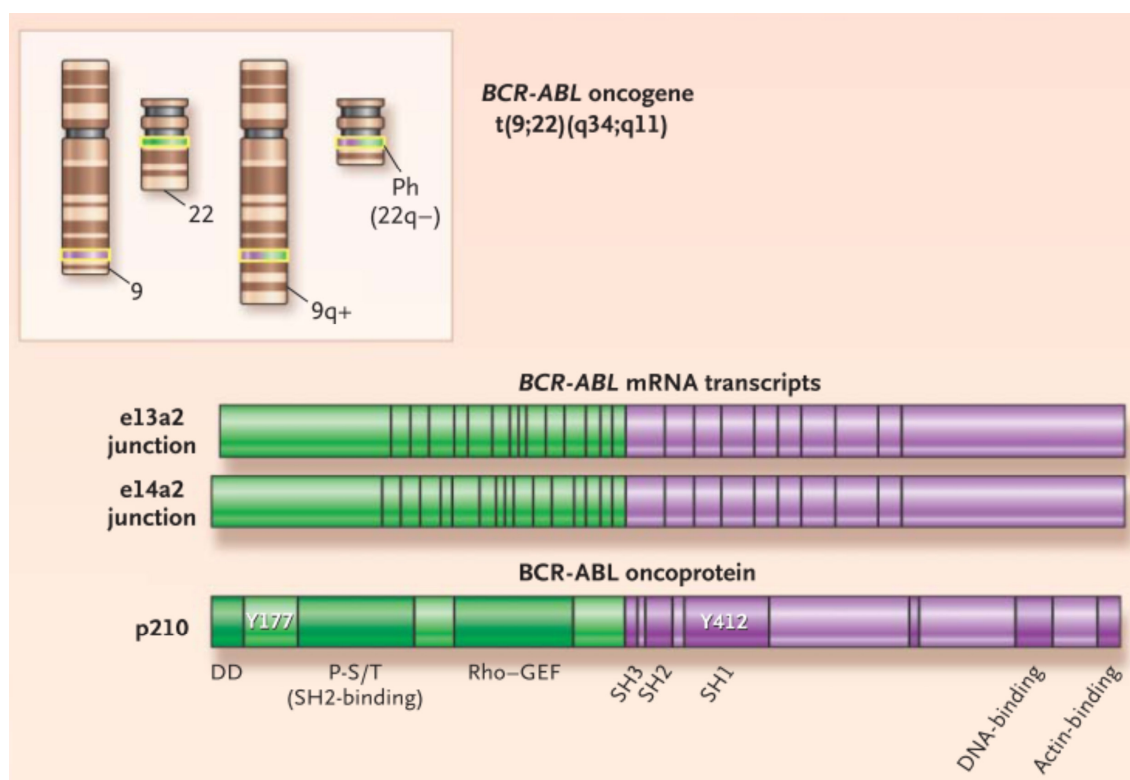


FIGURA 3 - FORMAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO FILADELFIA ORIGINANDO O GENE DE FUSÃO *BCR-ABL1* E SEUS TRANSCRITOS DE RNAm (e13a2 E e14a2) QUE CODIFICAM A PROTEÍNA p210<sup>Bcr-Abl1</sup>

FONTE: Goldman e Melo (2003)

No gene *BCR* existem outras regiões de quebra, mas que são raras na LMC típica: a *minor breakpoint cluster region* (m-BCR), cuja junção e1a2 no RNAm codifica a proteína p190<sup>Bcr-Abl1</sup>, e a *micro breakpoint cluster region* (μ-BCR), com junção e19a2, que codifica a proteína p230<sup>Bcr-Abl1</sup> (GOLDMAN; MELO, 2003). Além desses, outros tipos de transcritos têm sido identificados e designados de transcritos atípicos (MELO; DEININGER, 2004).

Independentemente do tipo de proteína Bcr-Abl1 formada (p210, p190 ou p230), o segmento da proteína Abl1 é praticamente constante, sugerindo que a agressividade e a linhagem celular (linfoide ou mieloide) envolvidas nas leucemias Filadelfia positivas são em razão da sequência da proteína Bcr que se encontra na proteína quimérica (MELO; DEININGER, 2004).

Na literatura existe controvérsia sobre o tipo da isoforma p210<sup>Bcr-Abl1</sup> estar associado (LE MOS *et al.*, 2005; LUCAS *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2010; HANFSTEIN *et al.*, 2014) ou não (GOLDMAN; MELO, 2003) a um melhor valor prognóstico.

A oncoproteína p210<sup>Bcr-Abl1</sup> contém domínios originalmente presentes nas proteínas ABL1 e BCR. O domínio *coiled-coil*, responsável pela dimerização da proteína Bcr-Abl1, está presente em todas as isoformas das proteínas Bcr-Abl1 por ser codificado pelo exon 1 do gene *BCR* (MELO; DEININGER, 2004). O gene *ABL1* codifica vários domínios presentes na proteína Bcr-Abl1, entre eles os domínios de homologia encontrados nas proteínas tirosina quinases da família Src denominados domínios SH (*Src Homology*): SH1, SH2 e SH3 (GOLDMAN; MELO, 2003).

O domínio SH1 é responsável pela atividade tirosina quinase, e nele localizam-se as regiões da alça de fosfato e da alça de ativação, a qual é crítica para a atividade catalítica, pois permite que a proteína flutue entre as conformações ativa e inativa (NARDI; AZAM; DALEY, 2003). O domínio SH2 é responsável pela ligação aos resíduos de fosfotirosina (NAGAR *et al.*, 2002). O domínio SH3 é capaz de promover ligação a regiões ricas em prolina encontradas em proteínas como a Crk e a Crkl (PRIETO-ECHAGÜE; MILLER, 2011). Outros domínios da proteína Abl1 também encontrados na proteína Bcr-Abl1 são: interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA), ligação à actina, sinais para localização nuclear (NLS, *nuclear localization signals*) e sequência para exportação nuclear (NES, *nuclear export sequence*) (FADERL *et al.*, 1999; DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000; CHEN *et al.*, 2010; PRIETO-ECHAGÜE; MILLER, 2011).

### 1.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELA BCR-ABL1

Os caminhos através dos quais essa ativação ocorre são complexos (Figura 4) e não estão perfeitamente esclarecidos, mas supõe-se que a proteína p210<sup>Bcr-Abl1</sup> ative os mesmos sinalizadores ativados por citocinas que controlam o crescimento e a diferenciação das células hematopoéticas normais (SAWYERS, 1999; DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000; REILLY, 2002).

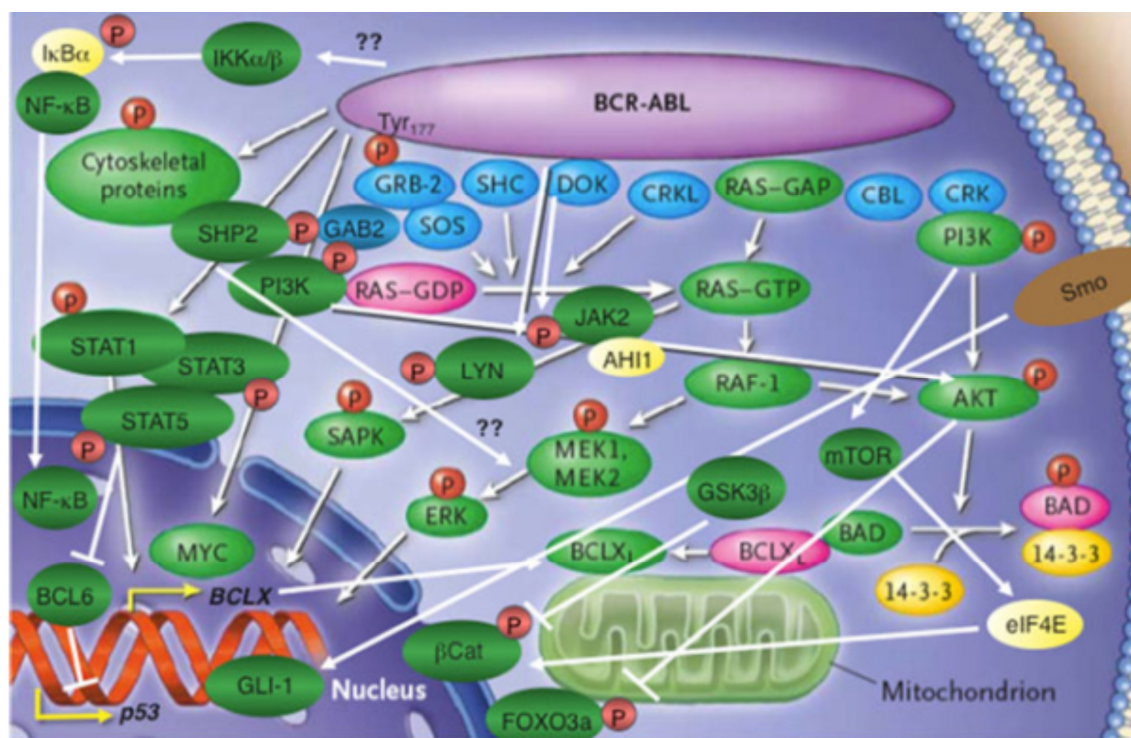


FIGURA 4 - VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ATIVADAS PELA PROTEÍNA Bcr-Abl1

FONTE: Ahmed e Van Etten (2013)

NOTA: A fosforilação é representada pela letra P maiúscula dentro do círculo vermelho; setas indicam a ativação da molécula à jusante e uma barra no fim da linha indica inibição da molécula à jusante.

Em consequência da atividade tirosina quinase aumentada, a oncoproteína p210<sup>Bcr-Abl1</sup> pode promover a fosforilação de vários substratos, ativando múltiplos sinais na cascata de transdução e ocasionando proliferação celular desregulada (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009; JAGANI; DORSCH; WARMUTH, 2010; AHMED; VAN ETEN, 2013; NAIR; TOLENTINO; HAZLEHURST, 2012), perda da diferenciação (SMITH; YACOBI; VAN ETEN, 2003; WEI; YAN; TANG, 2011; CILLONI; SAGLIO, 2012),

diminuição da aderência da célula leucêmica ao estroma da medula óssea (DANCE *et al.*, 2008; GOLDMAN; MELO, 2003; PIERRE; BATS; COULMOUL, 2011) e resposta reduzida aos estímulos apoptóticos (MELO; DEININGER, 2004; AICHBERGER *et al.*, 2005; AHMED; VAN ETEN, 2013; CILLONI; SAGLIO, 2012; VAKANA; PLATANIAS, 2011), garantindo a sobrevivência celular (JAGANI; DORSCH; WARMUTH, 2010; AHMED; VAN ETEN, 2013; NAIR; TOLENTINO; HAZLEHURST, 2012; VAKANA; PLATANIAS, 2011).

#### 1.4 FASES DA LMC

Essa doença é uma desordem maligna tipicamente trifásica: a fase crônica (FC), na qual ocorre expansão das células mieloides, mas que ainda retém a capacidade de diferenciação, a fase acelerada (FA) e, por último e mais agressiva, a crise blástica (CB) (CORTES; KANTARJIAN, 2012).

A grande maioria dos pacientes, em torno de 85-90%, é diagnosticada durante a fase crônica, ao realizarem exames hematológicos de rotina (PERROTTI *et al.*, 2010; LEITNER; HOCHHAUS; MÜLLER, 2011). No diagnóstico é usado um escore para estratificação do risco da doença. Entre eles estão o escore de Sokal (SOKAL *et al.*, 1984), que é o mais usado, o escore de Hasford (HASFORD; ALLAN; JOHANNA, 1998) e o escore EUTOS – *European Treatment Outcome Study* (HASFORD *et al.*, 2011).

A classificação das fases da doença é baseada em achados hematológicos, evolução clonal e presença de doença extramedular. Entre as classificações mais utilizadas estão as da *World Health Organization* (WHO) (SWERDLOW *et al.*, 2008) e a do M. D. Anderson Cancer Center (CORTES; KANTARJIAN, 2012).

A progressão para as fases avançadas, após uma média de cinco anos (LEITNER; HOCHHAUS; MÜLLER, 2011), é ocasionada pela perda da habilidade da célula em sofrer maturação (PERROTTI *et al.*, 2010) e pela instabilidade genômica (CALABRETTA; PEROTTI, 2004; MELO; BARNES, 2007; QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009; CHEN *et al.*, 2010; CORTES; KANTARJIAN, 2012), e reflete o curso natural da doença ou a falha de resposta ao tratamento a que o paciente é submetido (RADICH, 2007).

Os mecanismos moleculares envolvidos na progressão para a crise blástica não são perfeitamente compreendidos, mas baseiam-se na ativação de fatores oncogênicos e na inativação de genes supressores tumorais. A CB é considerada um processo que acontece em várias etapas e em que mecanismos dependentes e independentes da proteína Bcr-Abl1 participam, causando danos ao DNA (PERROTTI *et al.*, 2010; SACHS *et al.*, 2011; DAVIS, 2011) e provocando a falha na maquinaria de reparo do DNA durante a FC (PERROTTI *et al.*, 2010; CHUANG; ITO; ITO, 2013).

## 1.5 TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

O Licor de Fowler (trióxido de arsênico) foi usado no século XIX no tratamento da LMC e, no início do século XX, foi introduzida a radioterapia esplênica (DEININGER; DRUKER, 2003). Entretanto, esses procedimentos eram apenas paliativos, pois não apresentavam mudança significativa na sobrevida dos pacientes (LEITNER; HOCHHAUS; MÜLLER, 2011).

O uso do bussulfano, nos anos 1950, e da hidroxiureia, nos anos 1960, fez com que conseguissem pela primeira vez correlação com diminuição das contagens hematológicas, levando a uma resposta hematológica completa (RHC) (DEININGER, 2008; LEITNER; HOCHHAUS; MÜLLER, 2011).

A primeira revolução no tratamento da LMC aconteceu nos anos 1970, com a realização do transplante de células tronco-hematopoéticas (TCTH). Este procedimento foi capaz de conduzir à resposta citogenética completa (RCC) e à resposta molecular completa (RMC) na grande maioria dos pacientes, representando os primeiros casos de cura da doença (DEININGER, 2008). O interferon  $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) foi introduzido logo depois, com ele até 80% dos pacientes podiam alcançar a RHC e 32% atingiam a RCC (DEININGER; DRUKER, 2003). Entretanto, a alta incidência de efeitos colaterais e o fato de não ser um tratamento curativo tornaram cada vez menor o emprego desse agente (GEARY, 2000; DEININGER; DRUKER, 2003). Os principais marcos no tratamento da LMC estão representados na Figura 5.

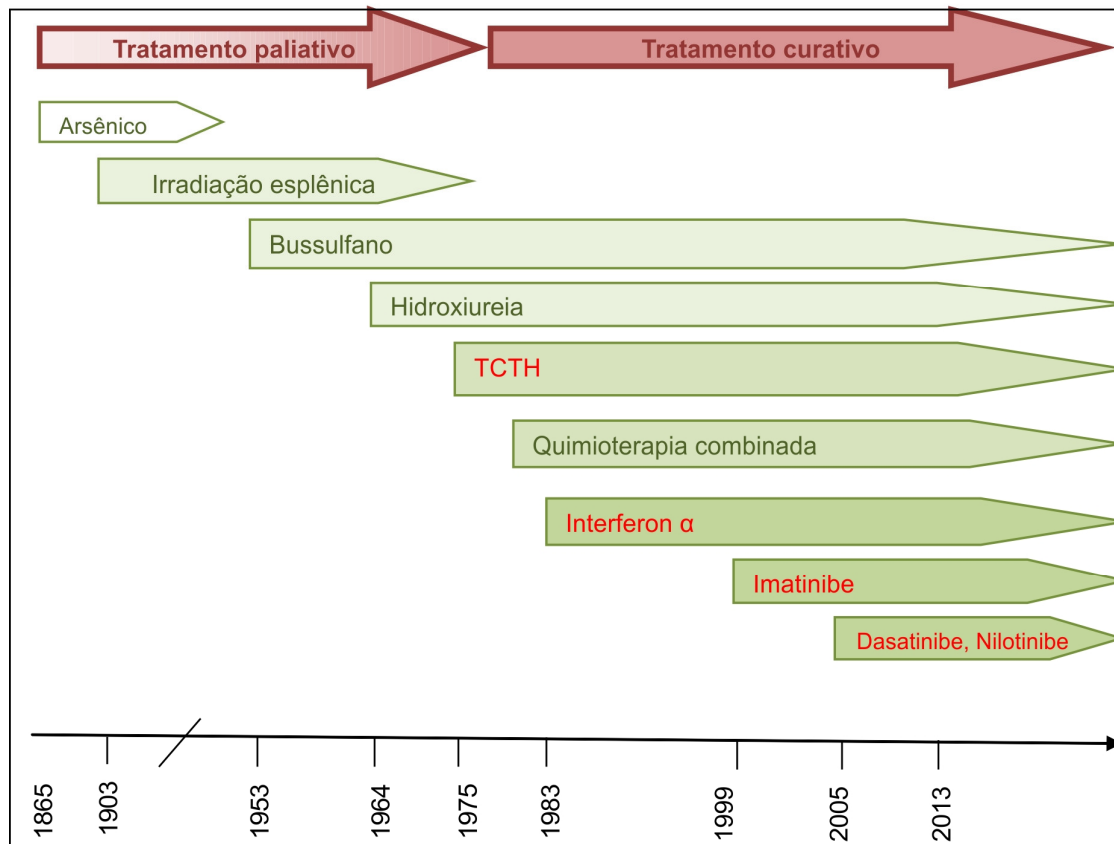


FIGURA 5 - HISTÓRICO DO TRATAMENTO EM LMC

FONTE: Adaptado de Hehlmann, Hochhaus e Baccarani (2007)

NOTA: O vermelho indica tratamentos geralmente empregados na fase cônica.

A segunda revolução no tratamento da LMC aconteceu no final da década de 1990 com a introdução do mesilato de imatinibe (MI - Glivec® – Novartis, Pharmaceutical Corp., East Hanover, N. J., USA), um inibidor da tirosina quinase (ITQ) de primeira geração (MAURO; DRUKER, 2001). Os resultados dos estudos clínicos demonstraram que o MI é capaz de reduzir o volume de células leucêmicas rapidamente e em elevadas proporções em um grande número de pacientes portadores dessa enfermidade (O'BRIEN *et al.*, 2008; MARIN *et al.*, 2005; DRUKER *et al.*, 2006; HUGHES *et al.*, 2010; HANFSTEIN *et al.*, 2012). Além de sua eficácia, o MI tem a vantagem de ser administrado por via oral (APPERLEY, 2007), apresentar baixa incidência de efeitos colaterais graves e alcançar níveis de remissão da doença não obtidos com drogas anteriormente utilizadas (MAURO; DRUKER, 2001). A intensidade e a rapidez da resposta ao tratamento servem de parâmetros no sentido prognóstico e no planejamento terapêutico. As respostas hematológica, citogenética e molecular são utilizadas para



quantificar a dimensão da redução das células leucêmicas no decorrer do tratamento. Por meio de vários estudos clínicos foi possível estabelecer alvos de resposta para serem alcançados em diferentes períodos de exposição à droga, particularmente na fase crônica da LMC (BACCARANI *et al.*, 2013).

O mecanismo de ação do MI (Figura 6) é baseado na competição com a molécula de adenosina trifosfato (ATP) (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000), em razão de sua capacidade de ligação ao domínio quinase da proteína quando esta se encontra na forma inativa (conformação fechada), promovendo sua estabilização e impedindo sua mudança para a forma ativa (conformação aberta), necessária para a ligação do ATP. Assim, o MI pode ser considerado um interceptador da proteína BCR-ABL1 em seu estado "desligado" (conformação inativa) (NARDI; AZAM; DALEY, 2003).

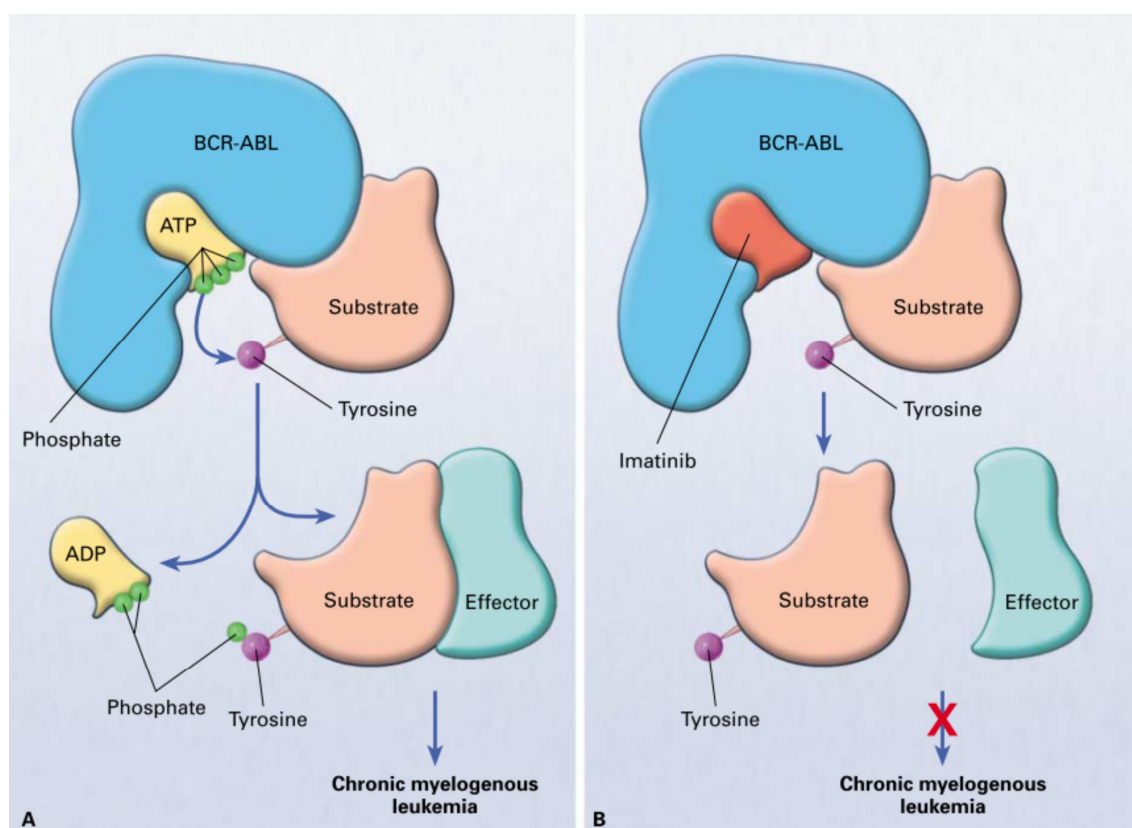


FIGURA 6 - MECANISMO DE AÇÃO DO MESILATO DE IMATINIBE.

FONTE: Goldman e Melo (2001)

NOTA: A figura A mostra a molécula de ATP ligada à proteína Bcr-Abl1 e a consequente fosforilação dos resíduos de tirosina do substrato que, quando fosforilado, ativa outras moléculas efetoras. A figura B mostra que quando o MI ocupa a fenda bloqueia a ligação do ATP, o que impede a fosforilação do substrato.

A partir de 2005, os inibidores da tirosina quinase de segunda geração, nilotinibe (Tasigna®, Novartis, Pharmaceutical Corp., EastHanover, N. J., USA) e dasatinibe (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb, EUA), foram introduzidos no tratamento de pacientes com LMC que apresentam resistência ou intolerância ao MI (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007). Entretanto, a mutação T315I é resistente tanto ao MI quanto aos inibidores de segunda geração. Apesar de esses agentes conduzirem a precoces e altas taxas de resposta ótima, seu impacto na sobrevida de longo prazo ainda precisa ser avaliado. Estudos clínicos estão em andamento com o ponatinibe, ITQ de terceira geração, o qual é eficaz contra a mutação T315I (JABBOUR; KANTARJIAN, 2012).

Os excelentes resultados da introdução do MI e dos inibidores de segunda geração no tratamento da LMC levaram inicialmente o TCTH ao ostracismo, com várias indagações sobre o seu potencial de uso na LMC ter chegado ao fim. Atualmente, o TCTH é o procedimento de escolha para os pacientes que apresentam resistência aos ITQs de segunda geração, para os pacientes que apresentam a mutação T315I e para aqueles pacientes que progridem para as fases avançadas da doença (LEITNER; HOCHHAUS; MÜLLER, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

## 1.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LMC

O fator prognóstico mais importante no tratamento da LMC com ITQ é a avaliação do nível da resposta. O uso do imatinibe conduz grande maioria dos pacientes à RCC e, mesmo após vários anos, os pacientes continuam a aprofundar esse nível de resposta (HUGHES; BRANFORD, 2006; O'BRIEN *et al.*, 2008; HUGHES *et al.*, 2010). A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Q-PCR) demonstrou ser uma ferramenta com acurácia e não laboriosa para monitorar esses pacientes (HUGHES; BRANFORD, 2006; HUGHES *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2011).

Em virtude das excelentes mudanças que a introdução do MI ocasionou no algoritmo de tratamento dos pacientes com LMC e com o acúmulo de dados dos estudos clínicos, um painel de especialistas - o *European Leukemia Network* (ELN) - propôs, em 2006 (BACCARANI *et al.*, 2006), que a avaliação dos resultados deveria ser por meio de análise das respostas hematológica, citogenética e molecular. Essas

recomendações foram revisadas em 2009 (BACCARANI *et al.*, 2009) e em 2013 (BACCARANI *et al.*, 2013). As definições dessas respostas estão no Quadro 1.

TIPO DE RESPOSTA	DEFINIÇÃO
Resposta hematológica completa (RHC)	Leucócitos $< 10 \times 10^9/L$ Ausência de granulócitos imaturos Basófilos $< 5\%$ Plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ Baço não palpável
Resposta citogenética completa (RCC)	Ausência de metáfases Ph+
Resposta citogenética parcial (RCP)	1% a 35% de metáfases Ph+
Resposta citogenética menor (RCm)	36% a 65% de metáfases Ph+
Resposta citogenética mínima (RCMin)	66% a 95% de metáfases Ph+
Ausência de resposta citogenética (ARC)	$> 95\%$ de metáfase Ph+
Resposta molecular maior (RMM)	Transcritos $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$

QUADRO 1 - DEFINIÇÃO DE RESPOSTA HEMATOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE ACORDO COM O EUROPEAN LEUKEMIA NETWORK

FONTE: Baccarani *et al.* (2009)

NOTA: EI = escala internacional.

A resposta hematológica é avaliada no sangue periférico por meio do hemograma e considera parâmetros como a contagem leucocitária, diferencial e plaquetária. A resposta citogenética é avaliada por meio de técnicas convencionais em aspirado de medula óssea ou pela hibridização fluorescente *in situ* (FISH). O termo resposta citogenética maior, usado em vários centros, engloba as respostas citogenética completa e parcial (O'BRIEN *et al.*, 2003).

A resposta molecular é avaliada no sangue periférico pela Q-PCR para quantificar o nível de transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*. As análises moleculares não precisam ser realizadas em aspirado de medula óssea, pois os resultados avaliados no sangue periférico e na medula óssea apresentam excelente correlação (HUGHES; BRANFORD, 2006). Essa resposta molecular é melhor representada pela razão entre o número de transcritos do gene *BCR-ABL1* e o número de transcritos do gene controle (genes *ABL1*, *BCR* ou *GUSB*), expressa em escala internacional (EI) e reportada em escala logarítmica (BACCARANI *et al.*, 2013). Dessa forma, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% e 0,001% correspondem a um decréscimo de 1, 2, 3, 4, 4,5 e 5 logs, respectivamente, abaixo da linha de base (100%) estabelecida no estudo denominado *International Randomised Study of Interferon versus STI571* (IRIS) (CROSS *et al.*, 2012; BACCARANI *et al.*, 2013). A expressão resposta molecular maior (RMM), objetivo a ser alcançado no tratamento com MI, representa uma

quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$ , e a expressão resposta molecular profunda (RMP) deve ser usada sempre acompanhada da indicação da sensibilidade do método (HUGHES *et al.*, 2003; HUGHES *et al.*, 2006; BACCARANI *et al.*, 2013). Dessa forma, RMP<sup>4,0</sup> indica transcritos detectados, porém, com quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI} < 0,01\%$  ou transcritos não detectados com número de transcritos do gene  $ABL1 > 10.000$  cópias ( $1 \times 10^4$  cópias), e RMP<sup>4,5</sup> indica transcritos detectados, porém, com quantificação  $BCR-ABL1^{EI} < 0,0032\%$  ou transcritos não detectados com número de cópias do gene  $ABL1 > 32.000$  cópias ( $3,2 \times 10^4$  cópias) (BACCARANI *et al.*, 2013). Baccarani *et al.* (2013) sugerem que a expressão resposta molecular completa (RMC) deve ser substituída por "leucemia molecularmente não detectável", sempre com a indicação do número de transcritos do gene controle.

Os atuais critérios (Quadro 2) estabelecidos pelo ELN para classificar o tipo de resposta ao tratamento com MI são úteis para identificar pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento e que necessitam de uma mudança no tipo desse tratamento o mais precocemente possível. Esses critérios classificam a resposta em ótima e falha de resposta, com um grupo intermediário denominado de sinais de alerta (BACCARANI *et al.*, 2013). O termo resposta subótima, que existia na classificação de 2009 (BACCARANI *et al.*, 2009), foi substituído pelo grupo de sinais de alerta. Ele indica um grupo de pacientes nos quais as características clínicas da doença e a resposta ao tratamento requerem uma monitoração mais frequente para garantir que esses pacientes possam se beneficiar da mudança de abordagem terapêutica em tempo hábil para não evoluírem para falha (BACCARANI *et al.*, 2013; FUNKE; PASQUINI, 2013).

A resposta ao tratamento com MI é definida como ótima se: aos três meses após o início do tratamento a quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$  alcançou a redução de 1 log; aos seis meses a quantificação  $BCR-ABL1^{EI}$  atingiu a redução de 2 logs e, aos 12 meses a quantificação  $BCR-ABL1^{EI}$  alcançou a redução de 3 logs ( $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$ ) (BACCARANI *et al.*, 2013).

TEMPO	ÓTIMA	SINAIS PARA ALERTA	FALHA
Ao diagnóstico	NA	Alto risco Sokal ou Hasford Evolução clonal em células Ph+	NA
3 meses	BCR-ABL1 $\leq$ 10% e/ou Ph+ $\leq$ 35%	BCR-ABL1 $>$ 10% e/ou Ph+ 36-95%	Menos que RHC e/ou Ph+ $>$ 95%
6 meses	BCR-ABL1 $<$ 1% e/ou ausência de Ph+	BCR-ABL1 1-10% e/ou Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 $>$ 10% e/ou Ph+ $>$ 35%
12 meses	BCR-ABL1 $\leq$ 0,1%	BCR-ABL1 $>$ 0,1-1%	BCR-ABL1 $>$ 1% e/ou Ph+ $>$ 0
A qualquer tempo	BCR-ABL1 $\leq$ 0,1%	Evolução clonal em células Ph- (-7 ou 7q-)	Perda de RHC Perda de RCC Perda de RMM <sup>(1)</sup> Mutações Evolução clonal em células Ph+

QUADRO 2 - DEFINIÇÃO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE DE ACORDO COM O EUROPEAN LEUKEMIA NETWORK

FONTE: Baccarani *et al.* (2013)

NOTA: NA = não se aplica; RHC = resposta hematológica completa; RCC = resposta citogenética completa; RMM = resposta molecular maior.

(1) Resultado confirmado em dois testes consecutivos, um dos quais com quantificação *BCR-ABL1*  $\geq$  1%.

A frequência da realização dos exames moleculares e de citogenética estão descritos no Quadro 3. A identificação do tipo de transcrito do gene de fusão *BCR-ABL1* deve ser realizada anteriormente ao início do tratamento, ou seja, ao diagnóstico, por PCR qualitativa (BACCARANI *et al.*, 2013).

PERÍODO	ANÁLISE A SER REALIZADA
Ao diagnóstico	PCR qualitativa Citogenética convencional FISH em caso de Ph-
Durante tratamento	Q-PCR: A cada 3 meses até RMM Após RMM, a cada 3 a 6 meses e/ou Citogenética convencional: Aos 3, 6 e 12 meses até obtenção da RCC Após RCC, a cada 12 meses e FISH
Falha de resposta ou progressão	Q-PCR Análise mutacional por método de Sanger Citogenética convencional Imunogenotipagem na FB
Sinais de alerta	Análises moleculares e citogenéticas realizadas com maior frequência Recomendada citogenética convencional em casos de MDS e evolução clonal em células Ph- com envolvimento do cromossomo 7

QUADRO 3 - RECOMENDAÇÕES PARA ANÁLISES LABORATORIAIS

FONTE: Baccarani *et al.* (2013)

NOTA: FISH = hibridização fluorescente *in situ*; Q-PCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; RMM = resposta molecular maior; FB = fase blástica; MDS = mielodisplasia.

As análises hematológicas devem ser realizadas a cada duas semanas até a obtenção da RCC e, então, a cada três meses no decorrer do tratamento (JABBOUR; KANTARJIAN, 2012).

## 1.7 HARMONIZAÇÃO DOS RESULTADOS MOLECULARES EM ESCALA INTERNACIONAL

Hughes *et al.* (2003) propuseram que a razão (%) BCR-ABL1 (n. de transcritos do gene *BCR-ABL1*/n. de transcritos do gene controle) fosse reportada como a redução em escala logarítmica ( $\log_{10}$ ) a partir de uma linha de base decorrente da mediana da quantificação de 30 amostras de pacientes com LMC-FC recém-diagnosticados. Esta mediana, diferente em cada laboratório, foi equalizada para 100% de carga leucêmica e atribuída a todo paciente ao diagnóstico independente do real valor encontrado para a quantificação *BCR-ABL1* em sua amostra. A RMM corresponderia à queda de 3 logs a partir desse valor da linha de base (0,1%).

A obtenção de respostas moleculares cada vez mais profundas e a necessidade de comparação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, independente da metodologia utilizada, levou um grupo de especialistas a estabelecer o uso de uma escala internacional para expressar o resultado final (HUGHES *et al.*, 2006). O uso de um fator de conversão (Fc) específico para cada laboratório permite a expressão do resultado na EI. Esse Fc ancora-se em dois valores: valor da linha de base internacional (BI) e valor da linha de base laboratorial (BL). O valor do BI corresponde a 100% e o valor do BL seria calculado conforme proposto por Hughes *et al.* (2003). Os valores de RMM derivados desses valores de linha de base originam o Fc por meio da divisão da RMM do BI pela RMM do BL. Os valores individuais de cada amostra, razão (%), multiplicados pelo fator de conversão, permitem obter os resultados em EI, tornando-os passíveis de comparação com resultados de outros centros, nacionais ou internacionais, que também estejam convertidos para a escala internacional. O Fc obtido desta forma deve ser validado por um laboratório de referência. Entretanto, o Fc pode ser determinado diretamente por um dos laboratórios de referência por meio do envio de amostras e seus respectivos resultados de quantificação de

transcritos *BCR-ABL1* por um laboratório específico (HUGHES *et al.*, 2006; BRANFORD *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2009) ou pelo uso de calibradores comerciais (WHITE *et al.*, 2010; WHITE *et al.*, 2013).

## 1.8 RESULTADOS DOS PRINCIPAIS ESTUDOS COM MI

Em junho de 1998, os primeiros estudos clínicos com MI foram realizados. No estudo de fase I, para determinação da dose, foram incluídos 83 pacientes com LMC-FC que falharam ao tratamento prévio com INF. Ao final desse estudo, a dose diária de 400 mg foi recomendada, pois foi associada a melhor efeito terapêutico (MAURO; DRUKER, 2001). Com os excelentes resultados desse estudo, logo se iniciaram os estudos de fase II e III.

Os estudos de fase II incluíram pacientes nas três fases da doença: FC intolerantes ou refratários ao INF, FA e pacientes em CB. A resposta hematológica completa foi alcançada por maior número de pacientes em FC e por menor número de pacientes em CB. O percentual de pacientes que atingiu a resposta citogenética completa foi de 28% entre os pacientes em FC, 14% entre aqueles em FA e 6% entre os pacientes em CB. Esse estudo de fase II evidenciou que o MI apresenta resultados em todas as fases da doença, mas que eles são significativamente melhores quando os pacientes se encontram na fase crônica da LMC (MAURO; DRUKER, 2001).

Em junho de 2000 se iniciava o estudo de fase III, denominado estudo IRIS. Os resultados desse estudo (N=1.106), estudo comparativo entre o emprego do interferon associado a citarabina (ARA-C) e mesilato de imatinibe no tratamento de pacientes recém-diagnosticados com LMC-FC, demonstraram que a probabilidade de se atingir uma RCC aos 18 meses de tratamento foi maior no grupo que recebeu imatinibe (76,2% *versus* 14,5%;  $p<0,001$ ) (O'BRIEN *et al.*, 2003).

Entre os pacientes que alcançaram a RCC, o nível de transcritos *BCR-ABL1*, monitorizados por meio da Q-PCR, tinha decaído pelo menos 3 logs aos 12 meses de tratamento em 57% dos pacientes do grupo do MI e em 24% no grupo que usou INF + ARA-C ( $p=0,003$ ). Essa redução de 3 ou mais logs correlacionava-se com uma probabilidade de progressão livre da doença de 100% em 24 meses, comparada a

95% para aqueles pacientes com redução menor que 3 logs e apenas 85% para aqueles sem RCC aos 12 meses ( $p<0,001$ ) (HUGHES *et al.*, 2003).

Na atualização de cinco anos do estudo IRIS, a taxa de RCC encontrada foi de 87%. Aqueles que alcançaram a RCC e a RMM aos 18 meses tinham um risco significativamente menor de progressão da doença quando comparados ao grupo que não alcançou a RCC ( $p<0,001$ ) (DRUKER *et al.*, 2006). Esses resultados apontaram duas metas a serem alcançadas no tratamento com MI para pacientes com LMC-FC: a RCC e a RMM.

A atualização de oito anos do estudo IRIS demonstrou que as respostas obtidas com o MI são duradouras. A taxa de sobrevida global (SG) estimada foi de 85% (ou 93% quando apenas mortes relacionadas à LMC eram consideradas), e que a sobrevida livre de eventos (SLE) era de 81%. A avaliação da taxa anual de eventos demonstrou ainda que um número muito pequeno de pacientes (3%) que alcançaram a RCC permanecia com risco de progressão da doença, e que entre aqueles que atingiram a RMM nenhum apresentou progressão (DEININGER, 2008).

A análise, por Hughes e Brandford (2006), de um subgrupo de pacientes do estudo IRIS demonstrou que o curso clínico da doença está correlacionado com a precoce redução no nível de transcritos *BCR-ABL1*. Entre aqueles pacientes que alcançaram a redução de 1 log aos três meses, a probabilidade de obtenção da RMM aos 24 meses era apenas de 13%, resultado muito inferior quando comparado com aqueles pacientes que apresentaram redução entre 1 e 2 logs e com o grupo que apresentou redução acima de 2 logs, nos quais a probabilidade de alcançar a RMM aos dois anos de tratamento foi de 69% e 100%, respectivamente.

De Lavallade *et al.* (2008) analisaram um grupo de 204 pacientes consecutivos recém-diagnosticados com LMC-FC em tratamento com MI 400 mg/dia e demonstraram que 39% dos pacientes alcançaram a RMM com mediana de 15,7 meses (variação de 2 a 73 meses) e 5% alcançaram a RMC com mediana de 30,7 meses (variação de 12 a 67,4 meses).

Um estudo do grupo do M. D. Anderson Cancer Center, que avaliou pacientes em tratamento com MI com doses diárias de 400 a 800mg, reportou resultados muito parecidos. Entre aqueles que tiveram redução menor que 1 log aos três meses de tratamento a probabilidade de obter subsequente RMM foi de apenas 33%. Já entre



aqueles com redução maior que 2 logs aos três meses de tratamento a probabilidade de alcançar a RMM foi de 84% (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009).

Resultados similares foram encontrados no estudo conduzido por Marin *et al.* (2012). Nesse estudo eles demonstraram que a análise do nível de transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$  aos três meses de tratamento é o melhor ponto para prever quais pacientes respondem pobremente ao MI, permitindo uma intervenção clínica precoce. O grupo de pacientes que apresentava quantificação  $BCR-ABL1^{EI} \leq 9,84\%$  (valor muito próximo à redução de 1 log) aos três meses de tratamento apresentava uma SG aos oito anos de 93,3% contra 56,9% ( $p < 0,001$ ) referente aos pacientes com  $BCR-ABL1^{EI} > 9,84\%$ . Esse estudo ainda apontou valores de transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$  aos três meses de tratamento com MI, que podem se correlacionar com excelentes resultados. Esses valores são muito próximos entre si para SG, para sobrevida livre de progressão (SLP), para SLE e para probabilidade de obtenção da RCC (9,84%, 9,54%, 9,84% e 8,58%, respectivamente). Entretanto, esses valores são muito diferentes dos valores preditivos de RMM e RMC (2,81% e 0,61%, respectivamente). Para os pacientes com  $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,61\%$  aos três meses, a incidência cumulativa de RMC aos oito anos de tratamento foi de 84,7% contra apenas 1,5% de RMC aos oito anos dentre os pacientes com  $BCR-ABL1^{EI} > 0,61\%$  aos três meses. Nesse estudo, 24,7% dos pacientes alcançaram a RMM aos 12 meses de tratamento.

O estudo conduzido pelo grupo alemão (HANFSTEIN *et al.*, 2012) identificou que, aos três meses de tratamento, 31% dos pacientes apresentavam transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 1\%$ , 41% dos pacientes tinham quantificação  $BCR-ABL1^{EI} > 1 - 10\%$  e 28% dos pacientes apresentavam transcritos  $BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ . Aos seis meses de tratamento, 63% dos pacientes apresentavam transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 1\%$ , 25% dos pacientes tinham transcritos  $BCR-ABL1^{EI} > 1 - 10\%$  e 12% dos pacientes apresentavam transcritos  $BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ . A avaliação molecular aos três meses de tratamento com MI também foi o marco encontrado nesse estudo como fator preditivo de SG e de SLP. Ficou demonstrado que a persistência de pacientes com transcritos  $BCR-ABL1^{EI} > 10\%$  indica um grupo de alto risco (SG=87% aos cinco anos) quando comparado aos pacientes com transcritos  $BCR-ABL1^{EI} > 1 - 10\%$  (SG=94% aos cinco anos;  $p=0,012\%$ ) e com transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 1\%$  (SG=97% aos cinco anos;  $p=0,004$ ). Os pacientes que aos seis meses de tratamento ainda permaneciam com  $BCR-ABL1^{EI} > 1\%$  apresentavam SG inferior aos pacientes com  $BCR-ABL1^{EI} \leq 1\%$  (SG

aos cinco anos de 89% e 91%, respectivamente;  $p < 0,001\%$ ). Esses dados demonstram que quanto mais precoce é a redução no número de transcritos *BCR-ABL1*<sup>El</sup> melhor é a evolução do tratamento.

Com o acúmulo de dados dos diversos estudos, entre eles o IRIS, a RMM passou a ser considerada o objetivo a se atingir o mais precocemente possível. Os pacientes que alcançam esse patamar apresentam uma probabilidade muito pequena de perda dessa resposta e progressão da doença na continuidade do tratamento (BACCARANI *et al.*, 2009; HUGHES *et al.*, 2010).

No Brasil, o primeiro estudo clínico de acesso expandido ocorreu em outubro de 2000 e, a partir de 25 de junho de 2008, os pacientes brasileiros com LMC em fase crônica passaram a receber MI como primeira linha de tratamento (BRASIL, 2008).

No trabalho de Funke *et al.* (2005), avaliando pacientes brasileiros, a RCC foi alcançada em 61% dos pacientes em FC, 24% dos pacientes em FA e nenhum paciente em CB alcançou essa resposta. A RMC foi alcançada em 9% dos 98 pacientes incluídos no estudo, sendo 7 (25%) dos 28 em FC e 2 (9%) dos 55 pacientes em FA. A mediana da razão *BCR-ABL1* para os pacientes em FC no momento da RCC, aos três e seis meses após atingirem a RCC, foi de 0,38%, 0,58% e 0,06%, respectivamente.

Nardinelli (2008), ao analisar o perfil de resposta de 61 pacientes brasileiros, inferiu que o valor da quantificação de transcritos *BCR-ABL1* aos três meses de tratamento com MI é um fator preditivo para a obtenção da RMM. Nesse estudo, pacientes com valores de transcritos *BCR-ABL1*  $\leq 1\%$  aos três meses de tratamento atingiram mais precocemente a RMM (mediana de sete meses) que pacientes com quantificação entre 1% e 10% (mediana de 12 meses).

No estudo de 39 pacientes brasileiros em tratamento com MI, Silveira (2011) observou que em 37,1% a RMM era alcançada com uma mediana de 18 meses (variação de 6 a 78 meses), e em 15,2% a RMC era obtida com uma mediana de 38 meses (variação de 18 a 97 meses). Outro recente estudo realizado com 60 pacientes brasileiros em FC verificou que em 40% deles a RMM foi alcançada aos 8,5 meses após o início do tratamento com MI (MACHADO *et al.*, 2011).

Frente a todos os dados disponíveis é incontestável a importância da monitoração dos transcritos *BCR-ABL1* através da Q-PCR para a precoce identificação de pacientes que são bons respondedores e daqueles que não irão apresentar resposta adequada ao MI, podendo se beneficiar com mudanças na estratégia de

tratamento, seja o uso de ITQ de segunda geração ou mesmo do TCTH. Essa avaliação molecular também auxilia na investigação da adesão do paciente ao tratamento, fator esse que é uma das principais causas de falha no tratamento.

Os dados obtidos com esse trabalho podem contribuir para a avaliação do grau de resposta molecular ao tratamento com MI em pacientes brasileiros, pois no Brasil a monitoração molecular não faz parte das exigências dos órgãos que administram o sistema de saúde, tanto público como privado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe 400mg/dia em pacientes brasileiros com LMC, em fase crônica, monitorados pela Q-PCR para quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil de resposta ao tratamento com MI em diferentes períodos de tempo.
- Analisar a magnitude da resposta nos pacientes que apresentam avaliações sequenciais em todos os períodos de tempo estabelecidos neste estudo.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

O Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) implantou, no ano de 1999, a metodologia para quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*, realizando inicialmente exames apenas para os pacientes que eram provenientes do Serviço de Transplante de Medula Óssea desse hospital, serviço atualmente designado de Unidade de Hematologia, Hemoterapia e Oncologia (UHHO). Posteriormente, passou também a monitorar pacientes em tratamento com mesilato de imatinibe provenientes do Ambulatório de Leucemia Mieloide Crônica desse hospital. Com a implantação da Q-PCR, o laboratório passou a receber amostras de pacientes de outras instituições nacionais para realizar a quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*.

Entre outubro de 2002 e outubro de 2010 esse serviço realizou a monitoração dos transcritos *BCR-ABL1* em 12.453 amostras. Dessas, 3.169 amostras foram incluídas neste estudo por preencherem todos os critérios de inclusão: pacientes brasileiros com LMC, em fase crônica, em tratamento com MI na dose de 400 mg/dia, monitorados por meio da Q-PCR e com idade  $\geq 18$  anos. As 9.284 (74,6%) amostras não incluídas neste estudo foram: 230 (2,5%) de pacientes não brasileiros; 48 (0,5%) de pacientes com idade inferior a 18 anos; 388 (4,2%) de pacientes com diagnóstico de LLA; 1.040 (11,2%) de pacientes submetidos a outros tratamentos (TCTH, inibidores tirosina quinase de segunda geração, interferon ou hidroxiureia); 620 (6,7%) de pacientes que não estavam na fase crônica da doença; 4.103 (44,2%) que não possuíam informação quanto ao tipo de tratamento e/ou fase da doença e/ou dose do MI; 920 (9,9%) amostras de diagnóstico ou inferior a três meses de tratamento; 320 (3,4%) de pacientes usando MI na dose de 600 ou 800 mg/dia; e 1.615 (17,4%) de pacientes que apresentavam mais de uma amostra no mesmo período de tempo deste estudo e que foram excluídas para que um mesmo paciente não tivesse duas amostras analisadas no mesmo intervalo.

Este estudo foi realizado por meio de uma análise retrospectiva dos dados de quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*, em 3.169 amostras de sangue periférico coletado com EDTA, representando 1.403 pacientes brasileiros com LMC em fase crônica, submetidos ao tratamento com mesilato de imatinibe 400mg/dia, cujas amostras foram referidas para o Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR. Em 60 (4,3%) pacientes não foi possível a identificação do tipo de transcrito *BCR-ABL1*, pois quando as amostras foram encaminhadas para monitoração do tratamento, esses pacientes já se encontravam em resposta molecular profunda e não tinham nenhuma informação prévia quanto ao tipo de transcrito *BCR-ABL1*. Mesmo assim, eles foram incluídos neste estudo por apresentarem diagnóstico clínico prévio consistente com LMC e estarem em uso de MI 400 mg/dia.

As informações gerais de cada paciente, como sexo, data de nascimento, instituição de origem, fase da doença, data de início do uso e dose do MI foram extraídas de um formulário que acompanhou as amostras enviadas ao Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR para realização da análise molecular quantitativa. O envio das amostras para pacientes procedentes de outros centros ocorreu à temperatura ambiente via transportadora ou SEDEX 10. As amostras foram processadas imediatamente ao chegarem ao laboratório, sendo que o tempo decorrido entre a coleta e a estabilização do RNA de cada amostra não ultrapassou 24 horas. Amostras que apresentavam tempo maior que 24 horas entre coleta e a estabilização do RNA foram desprezadas.

Os pacientes provinham de nove estados brasileiros – Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Minas Gerais, Goiás, Alagoas, Espírito Santo – e do Distrito Federal. A maioria, de um total de 26, das instituições de origem desses pacientes era pública, sendo que apenas três eram instituições privadas.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-UFPR (Anexo 1).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Estabilização e extração do RNA

Um volume de 16 a 20ml de sangue periférico foi coletado em EDTA e tratado com 0,144 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 0,01 M de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , dentro de 24 horas após a coleta, para lise das células vermelhas, conforme descrito por Brandford, Hughes e Rudzki (1999). Para as amostras processadas até setembro de 2006, o RNA de  $1 \times 10^7$  células foi estabilizado em 1000  $\mu\text{L}$  de solução GTC (tiocianato de guanidina 4M, EDTA 5mM, n-laurilsarcosil 0,5% e citrato de sódio 25mM pH 7,0) contendo 0,71% de  $\beta$ -mercaptoetanol, de acordo com Cross *et al.* (1993b), e extraído usando-se Rneasy Mini™Kits (Qiagen, UK) conforme as instruções do fabricante. Após esse período, o RNA foi estabilizado em 1000 $\mu\text{L}$  Trizol® (Invitrogen, USA) e extraído com clorofórmio/isopropanol de acordo com as instruções do fabricante. A água ultrapura utilizada no preparo da solução de lise de células vermelhas e para reconstituição do RNA foi tratada com dietilpirocarbonato 0,1%.

### 3.2.2 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A RT-PCR para a obtenção do DNA complementar (DNAc) foi realizada com o uso de hexâmeros randomizados de acordo com o descrito por Cross *et al.* (1993a).

### 3.2.3 Identificação do tipo de transcrito do gene *BCR-ABL1*

O tipo de transcrito do gene *BCR-ABL1* foi identificado utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex, conforme o descrito por Cross *et al.* (1994),

exceto a substituição do banho de gelo pela enzima *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen, USA) para viabilizar o *hot start*.

As amostras foram amplificadas em termociclador ABI 9700 PCR System (Applied Biosystems Inc., USA). Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2g% para identificação do tipo de transcrito do gene *BCR-ABL1*. Além da amplificação dos fragmentos específicos (b2a2 = 310 pb; b3a2 = 385 pb; e1a2 = 481 pb), um fragmento de 808 pb era amplificado pelo anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores B2B e C5e- ao gene *BCR*, funcionando como controle interno da reação PCR.

As amostras que apresentavam resultado negativo por meio da análise da PCR Multiplex foram submetidas à PCR *Nested*, conforme Cross *et al.* (1993a). Após a PCR *Nested*, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2g% para identificação do tipo de transcrito *BCR-ABL1*.

### 3.2.4 Quantificação dos transcritos do gene *BCR-ABL1*

As amostras foram quantificadas pela metodologia da Q-PCR utilizando o sistema de sonda de hidrólise TaqMan™ (Applied Biosystems Inc., USA), de acordo com o descrito por Marin *et al.* (2005), em um termociclador ABIPRISM 7500 PCR System (Applied Biosystems Inc., USA). Nessa reação, além dos oligonucleotídeos iniciadores, foi usada uma sonda marcada com dois fluoróforos: um *reporter* (FAM) na extremidade 5' e um *quencher* (TAMRA) na extremidade 3'.

Os dados de intensidade de fluorescência para cada amostra foram analisados com o auxílio do *software* SDS v. 1.2 do ABIPRISM 7500 PCR System, que fornece o número de cópias tanto do gene de fusão *BCR-ABL1* quanto do gene *ABL1*, usado como controle.

O valor do *threshold* foi ajustado em 0,05 e o coeficiente de aceitação ( $R^2$ ) para os valores da curva padrão deviam estar próximos a 1 ( $\geq 99,0\%$ ). O *slope* (inclinação da curva padrão) foi considerado válido se os valores obtidos estivessem entre - 3,3 e - 3,6.



Em cada análise foram incluídos dois controles negativos (um que acompanhou todas as amostras desde a etapa da RT-PCR e outro que foi acrescentado no momento de realização da Q-PCR) e dois controles positivos (linhagem K562 com valor de quantificação acima de 70% e uma amostra representando a RMM).

A curva padrão foi gerada para cada ensaio usando uma diluição seriada de plasmídeos pNC210/G linearizados, contendo o inserto *BCR-ABL1*, construídos por Cross *et al* (1993b). Foram usadas três diluições para o gene *ABL1* e seis diluições para o gene de fusão *BCR-ABL1*. As análises foram realizadas em duplicata tanto para a curva padrão quanto para as amostras dos pacientes.

Os resultados foram reportados como a razão (%) entre o número de cópias do gene *BCR-ABL1* e o número de cópias do gene *ABL1* ( $BCR-ABL1/ABL1 \times 100$ ). Essa razão foi multiplicada pelo fator de conversão (0,51) do Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR a fim de converter os valores para escala internacional. O Fc foi determinado pela comparação dos resultados de quantificação dos transcritos do gene *BCR-ABL1* em 30 amostras analisadas no HC-UFPR e também no laboratório de referência "Institute of Medical and Veterinary Science", Adelaide, Austrália. O método estatístico utilizado pelo laboratório de referência para obter o fator de conversão foi o de Bland e Altman (BRANFORD *et al.*, 2008). O valor do Fc foi consolidado pelo mesmo laboratório de referência por meio da análise de uma segunda remessa de 30 amostras.

A sensibilidade do método é de 4,5 logs.

Todos os resultados de quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1* foram baseados em amostras com número de cópias do gene *ABL1*  $\geq 32.000$ . As amostras com transcritos não detectados pela Q-PCR foram confirmadas pela PCR *Nested*.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise estatística descritiva.

## 4 RESULTADOS

As características dos pacientes (n=1.403) foram sumarizadas na Tabela 1. Houve o encaminhamento de um total de 3.169 amostras, as quais foram agrupadas em cinco categorias de acordo com o tempo decorrido entre o início do tratamento com MI e o momento da coleta do sangue periférico para a avaliação quantitativa da resposta ao tratamento com o inibidor.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI

CARACTERÍSTICAS	NÚMERO		%
Idade ao diagnóstico (anos)			
Mediana	46,6 anos <sup>(1)</sup>		
Variação	19 a 85 anos		
Sexo			
Masculino	771		55,0
Feminino	632		45,0
Número de amostras/paciente			
Mediana		2	
Variação		1-5	
Tipo de transcrito <sup>(2)</sup>			
e14a2 (b3a2)	674		50,2
e13a2 (b2a2)	557		41,5
e14a2 e e13a2	112		8,3

FONTE: Banco de Dados do Laboratório de Imunogenética HC-UFPR

(1) Dado obtido com a análise de 1.382 pacientes.

(2) Dado obtido com a análise de 1.343 pacientes.

A distribuição do número de amostras em cada período de tempo encontra-se na Tabela 2. Observa-se que 32,2% das amostras se encontram no período  $\geq 24$  meses de tratamento e o menor número de amostras se encontra no primeiro intervalo de tempo.

O número de amostras por paciente variou de um a cinco (mediana = 2). Essa distribuição encontra-se na Tabela 3.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DE ACORDO COM O TEMPO (MESES) DE TRATAMENTO COM MI

TEMPO (MESES)	3 A 5	6 A 11	12 A 17	18 A 23	$\geq 24$
Número de amostras	339 (10,7%)	574 (18,1%)	628 (19,8%)	606 (19,1%)	1.022 (32,2%)

FONTE: A autora (2014)

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS POR PACIENTE

NÚMERO DE AMOSTRAS	1	2	3	4	5
Número de pacientes	523 (37,3%)	337 (24%)	282 (20,1%)	179 (12,8%)	82 (5,8%)

FONTE: A autora (2014)

Para a avaliação do perfil da resposta, obtida por meio da análise de Q-PCR, as amostras foram divididas em três grupos de acordo com o resultado:

- quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \geq 40\%$ ;
- quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} > 10\%$  e  $< 40\%$ ;
- quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ .

Os dados dessa análise englobando os 1.403 pacientes estão demonstrados na Tabela 4 e no Gráfico 1. No primeiro intervalo de tempo 80,8% das amostras haviam alcançado a redução de pelo menos 1 log na quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$ , chegando a 92,6% das amostras no último período de tempo.

TABELA 4 - RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI. ESSA ANÁLISE INCLUI AS 3.169 AMOSTRAS DISTRIBUÍDAS EM CINCO PERÍODOS DE TEMPO

% DE TRANSCRITOS $BCR-ABL1^{EI}$	TEMPO (MESES)				
	3 a 5	6 a 11	12 a 17	18 a 23	$\geq 24$
$\geq 40\%$	5(1,5%)	3(0,5%)	6(1,0%)	6(1,0%)	6(0,6%)
$> 10\%$ e $< 40\%$	60(17,7%)	60(10,5%)	42(6,7%)	33(5,4%)	70(6,8%)
$\leq 10\%$	274(80,8%)	511(89%)	580(92,3%)	567(93,6%)	946(92,6%)
Total de amostras	339	574	628	606	1.022

FONTE: A autora (2014)

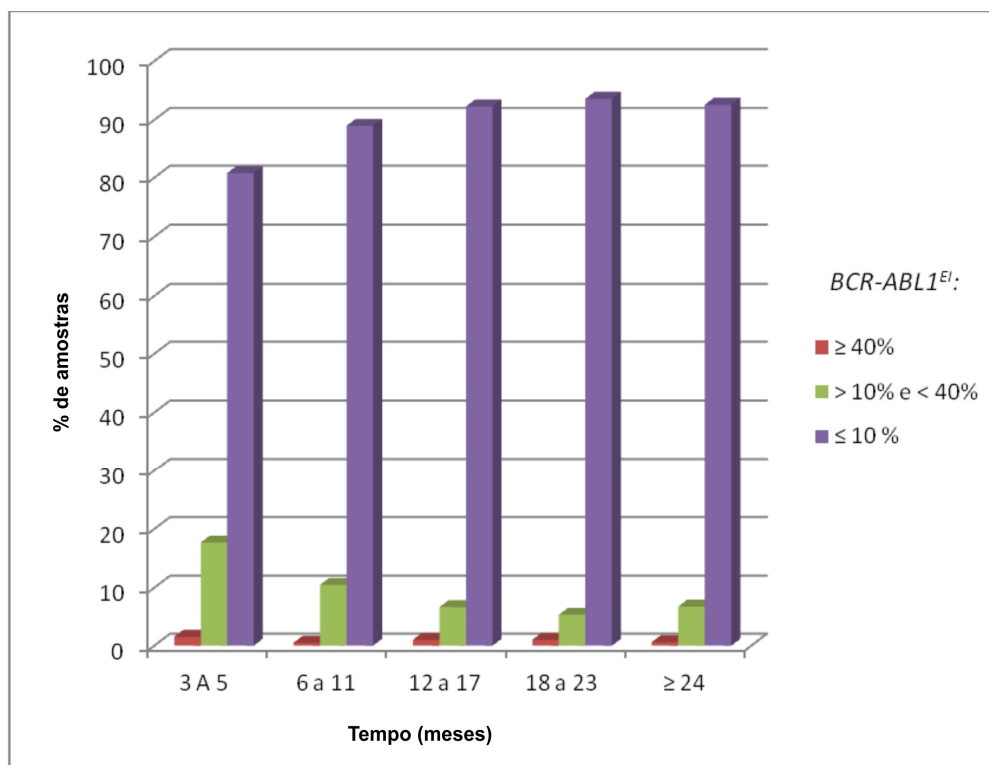


GRÁFICO 1 - PERFIL DA RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI

FONTE: A autora (2014)

NOTA: Essa análise inclui as 3.169 amostras distribuídas em cinco períodos de tempo.

Para as amostras com quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$  foi realizada nova análise, agrupando-as de acordo com os seguintes critérios:

- quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$  e  $> 1\%$ ;
- quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 1\%$  e  $> 0,1\%$ ;
- quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$  e, dentre estas,
- quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,0032\%$ , e também aquelas com transcritos não detectados.

Os dados referentes a análise das amostras com quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$  encontram-se na Tabela 5 e no Gráfico 2. No período entre três e cinco meses de tratamento, 29,8% das amostras mostraram redução de 2 logs, 22,4% alcançaram a redução de pelo menos 3 logs. No último intervalo de tempo, 61,8% das amostras alcançaram a redução de, no mínimo, 3 logs.

TABELA 5- RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$

% DE TRANSCRITOS $BCR-ABL1^{EI}$	TEMPO (MESES)				
	3 a 5	6 a 11	12 a 17	18 a 23	$\geq 24$
$\leq 10\%$ e $> 1\%$	97(28,6%)	114(19,9%)	92(14,6%)	66(10,9%)	115(11,2%)
$\leq 1\%$ e $> 0,1\%$	101(29,8%)	177(30,8%)	191(30,4%)	151(24,9%)	200(19,6%)
$\leq 0,1\%$	76(22,4%)	220(38,3%)	297(47,3%)	350(57,8%)	631(61,8%)
$\leq 0,0032\%$	54(15,9%)	171(29,8%)	220(35%)	264(43,6%)	444(43,4%)
Não detectados	9 (2,7%)	30(5,2%)	55 (8,8%)	58 (9,6%)	161 (15,8%)
Total de amostras	339	574	628	606	1.022

FONTE: A autora (2014)

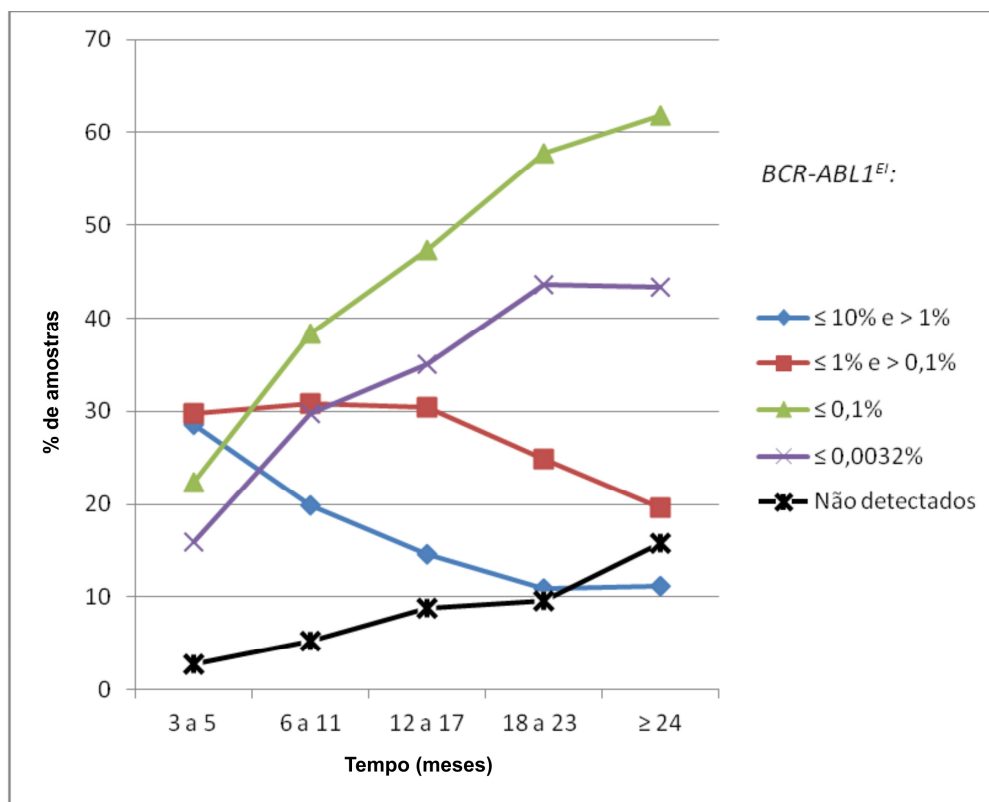


GRÁFICO 2 - PERFIL DA RESPOSTA DE 1.403 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$

FONTE: A autora (2014)

Dentre as 3.169 amostras, 1.488 (47%) eram provenientes de cinco instituições e representam 596 (42,5%) do total de 1.403 pacientes. Essas instituições são todas públicas, sendo quatro (4) localizadas na região Sul e uma (1) na região Sudeste do Brasil. As outras 1.681 (53%) amostras representam 807 (57,5%) pacientes e eram oriundas de 21 instituições. Devido ao fato de praticamente metade das amostras serem procedentes de apenas cinco centros, elas foram divididas em dois grupos: grupo A, compreendendo as 1.488 amostras desses cinco centros, e grupo B, compreendendo as 1.681 amostras provenientes das outras 21 instituições.

A distribuição das amostras dos grupos A e B, de acordo com os cinco períodos de tempo estabelecidos para este estudo, está representada na Tabela 6.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DOS GRUPOS A E B DE ACORDO COM O TEMPO (MESES) DE TRATAMENTO COM MI

TEMPO (MESES)	3 A 5	6 A 11	12 A 17	18 A 23	≥ 24
N.º de amostras do Grupo A	160 (10,8%)	255 (17,1%)	294 (19,8%)	301 (20,2%)	478 (32,1%)
N.º de amostras do Grupo B	179 (10,6%)	319 (19,0%)	334 (19,9%)	305 (18,1%)	544 (32,4%)

FONTE: A autora (2014)

O perfil da resposta foi analisado nos grupos A e B seguindo os mesmos critérios adotados anteriormente na análise das 3.169 amostras. Os resultados dessa análise para os dois grupos estão representados na Tabela 7 e nos Gráficos 3 e 4.

TABELA 7 - PERFIL DA RESPOSTA DOS 1.403 PACIENTES DISTRIBUÍDOS NOS GRUPOS A E B

% DE TRANSCRITOS <i>BCRABL1<sup>El</sup></i>	TEMPO (MESES)									
	3 a 5 meses		6 a 11 meses		12 a 17 meses		18 a 23 meses		≥ 24 meses	
	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
≥ 40%	1 (0,6%)	4 (2,2%)	2 (0,8%)	1 (0,3%)	3 (1,0%)	3 (0,9%)	5 (1,7%)	1 (0,3%)	1 (0,2%)	5 (0,9%)
> 10% e < 40%	21 (13,1%)	39 (21,8%)	18 (7,1%)	42 (13,2%)	16 (5,5%)	26 (7,8%)	11 (3,6%)	22 (7,2%)	24 (5,0%)	46 (8,5%)
≤ 10%	138 (86,3%)	136 (76,0%)	235 (92,1%)	276 (86,5%)	275 (93,5%)	305 (91,3%)	285 (94,7%)	282 (92,5%)	453 (94,8%)	493 (90,6%)
Total de amostras	160	179	255	319	294	334	301	305	478	544

FONTE: A autora (2014)

NOTA: GRUPO A - 1.488 amostras provenientes de pacientes de cinco instituições; GRUPO B - 1.681 amostras provenientes de pacientes de 21 instituições.

No primeiro intervalo de tempo, 86,3% das amostras presentes no grupo A alcançaram a quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$  e 76% das amostras do grupo B alcançaram esse mesmo patamar de resposta.

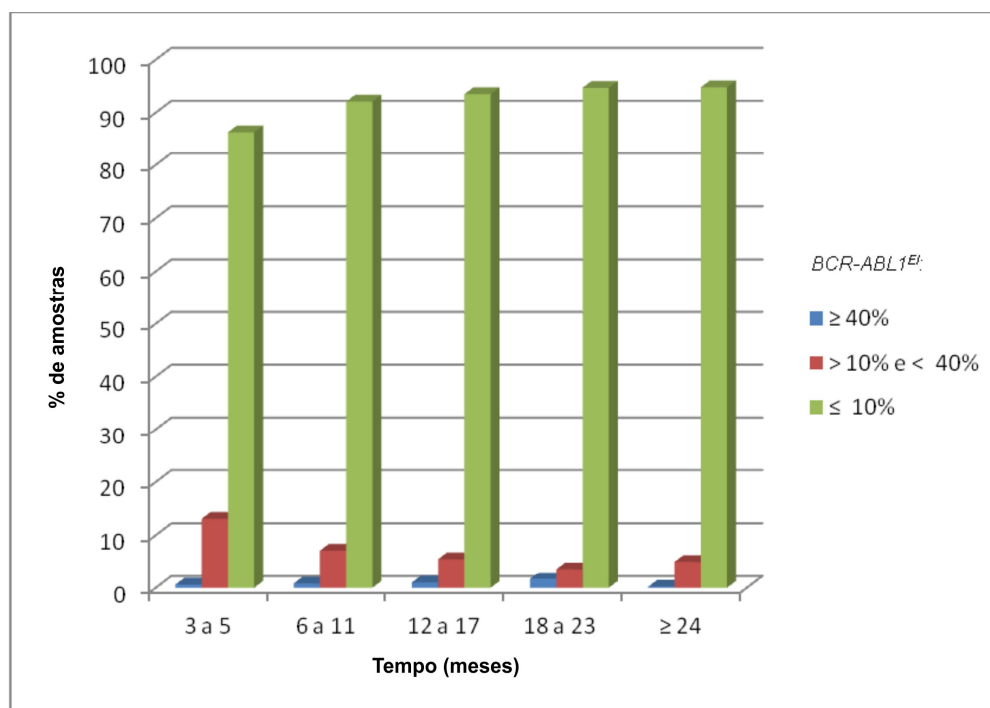


GRÁFICO 3 - PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.488 AMOSTRAS INCLUÍDAS NO GRUPO A E ORIUNDAS DE CINCO CENTROS  
 FONTE: A autora (2014)



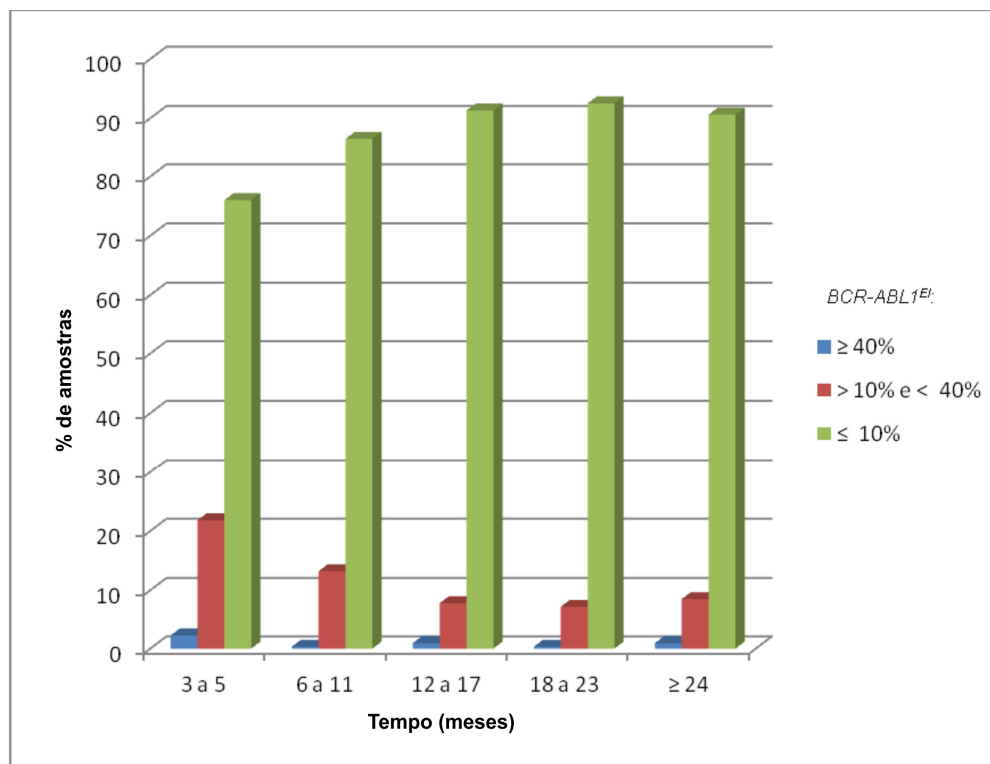


GRÁFICO 4 - PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.681 AMOSTRAS INCLUÍDAS NO GRUPO B E ORIUNDAS DE 21 CENTROS

FONTE: A autora (2014)

Também foi realizada a análise dos dados das amostras com quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$  nos grupos A e B. Os dados dessa análise estão na Tabela 8 e nos Gráficos 5 e 6. No primeiro intervalo de tempo, 31,9% das amostras do grupo A tiveram a redução de 2 logs, 25,6% alcançaram a redução de pelo menos 3 logs. Para o grupo B, neste mesmo intervalo, 28% das amostras mostraram a redução de 2 logs, 19,5% a redução de pelo menos 3 logs.

TABELA 8 - PERFIL DA RESPOSTA NOS GRUPOS A E B PARA AMOSTRAS COM QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ 

% DE TRANSCRITOS $BCR-ABL1^{EI}$	TEMPO (MESES)									
	3 a 5 meses		6 a 11 meses		12 a 17 meses		18 a 23 meses		≥ 24 meses	
	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
≤ 10% e > 1%	46 (28,8%)	51 (28,5%)	51 (20%)	63 (19,7%)	41 (13,9%)	51 (15,3%)	26 (8,6%)	40 (13,1%)	50 (10,5%)	65 (11,9%)
≤ 1% e > 0,1%	51 (31,9%)	50 (28%)	73 (28,6%)	104 (32,6%)	99 (33,7%)	92 (27,5%)	76 (25,3%)	75 (24,6%)	100 (20,9%)	100 (18,4%)
≤ 0,1%	41 (25,6%)	35 (19,5%)	111 (43,5%)	109 (34,2%)	135 (45,9%)	162 (48,5%)	183 (60,8%)	167 (54,8%)	303 (63,4%)	328 (60,3%)
≤ 0,0032%	25 (15,6%)	29 (16,2%)	79 (30,9%)	92 (28,8%)	102 (34,7%)	118 (35,3%)	144 (47,8%)	120 (39,3%)	235 (49,2%)	209 (38,4%)
Não detectados	7 (4,4%)	2 (1,1%)	18 (7,1%)	12 (3,8%)	32 (10,9%)	23 (6,9%)	29 (9,6%)	29 (9,5%)	80 (16,7%)	81 (14,9%)
Total de amostras	160	179	255	319	294	334	301	305	478	544

FONTE: A autora (2014)

NOTA: GRUPO A - 1.488 amostras provenientes de pacientes de cinco instituições; GRUPO B - 1.681 amostras provenientes de pacientes de 21 instituições.

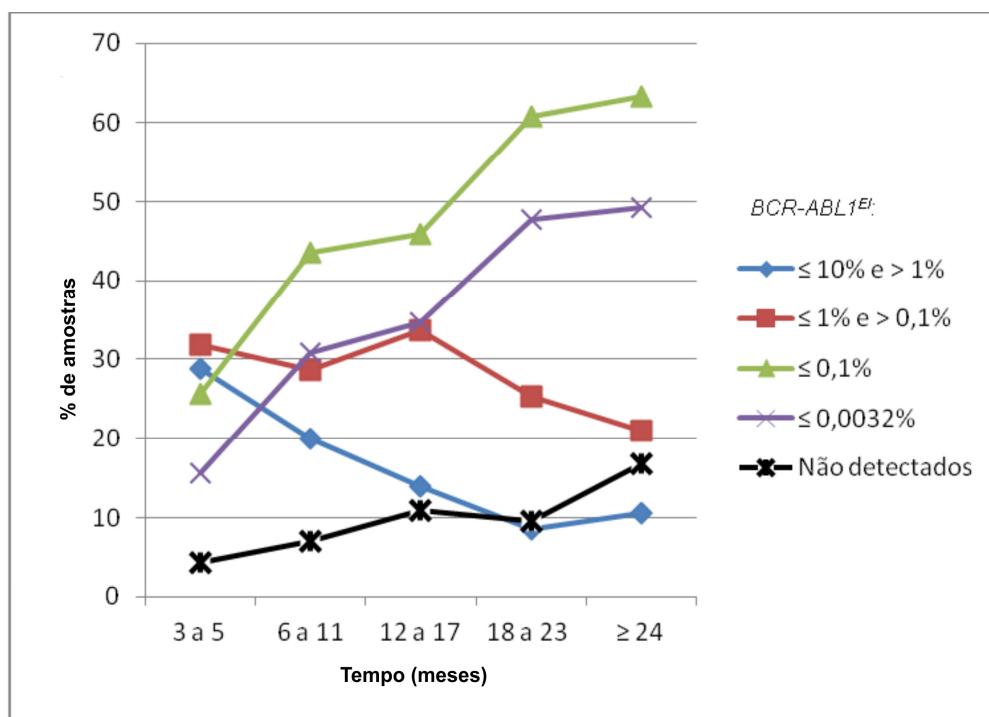


GRÁFICO 5 - PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.488 AMOSTRAS DO GRUPO A COM QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$

FONTE: A autora (2014)

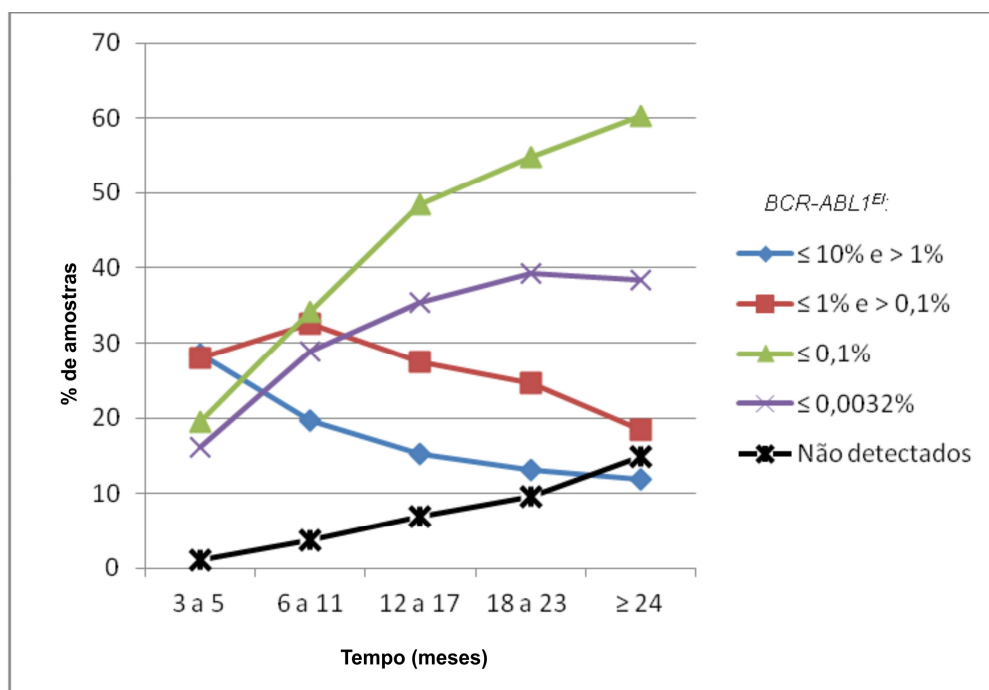


GRÁFICO 6 - PERFIL DA RESPOSTA NAS 1.681 AMOSTRAS DO GRUPO B COM QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$

FONTE: A autora (2014)

Dentre o total de 1.403 pacientes desta casuística, 82 tinham amostras disponíveis e analisadas consecutivamente em todos os períodos de tempo. Em decorrência desta observação os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo C, compreendendo os 82 pacientes com amostras (n=410) disponíveis e analisadas em todos os intervalos, e grupo D, com 1.321 pacientes sem amostras (n=2.759) analisadas em todos os períodos de tempo deste estudo. Os dados obtidos a partir da análise da resposta ao tratamento nestes dois grupos de pacientes estão demonstrados na Tabela 9 e nos Gráfico 7 e 8. No primeiro intervalo de tempo, 78,1% das amostras do grupo C e 81,7% do grupo D alcançaram a quantificação  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ , e esse índice aumentou para 100% das amostras incluídas no grupo C no período  $\geq 24$  meses após o início do MI *versus* 92% das amostras presentes no grupo D.

Foi realizada uma análise estratificada das amostras com quantificação de transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$  no grupo de 82 pacientes (grupo C) e no de 1.321 pacientes (grupo D). Os dados se encontram na Tabela 10 e nos Gráficos 9 e 10. No intervalo entre 12 e 17 meses, 45,1% das amostras incluídas no grupo C e 47,7% das amostras do grupo D obtiveram a redução de, no mínimo, 3 logs.

TABELA 9 - PERFIL DA RESPOSTA DOS 1.403 PACIENTES DISTRIBUÍDOS NOS GRUPOS C E D

% DE TRANSCRITOS <i>BCRABL1<sup>El</sup></i>	TEMPO (MESES)									
	3 a 5 meses		6 a 11 meses		12 a 17 meses		18 a 23 meses		≥ 24 meses	
	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D
≥ 40%	2 (2,4%)	3 (1,2%)	1 (1,2%)	2 (0,4%)	1 (1,2%)	5 (0,9%)	-	6 (1,1%)	-	6 (0,6%)
> 10% e < 40%	16 (19,5%)	44 (17,1%)	7 (8,5%)	53 (10,8%)	3 (3,7%)	39 (7,1%)	-	33 (6,3%)	-	70 (7,4%)
≤ 10%	64 (78,1%)	210 (81,7%)	74 (90,2%)	437 (88,8%)	78 (95,1%)	502 (92%)	82 (100%)	485 (92,6%)	82 (100%)	864 (92%)
Total de amostras	82	257	82	492	82	546	82	524	82	940

FONTE: A autora (2014)

NOTA: GRUPO C - amostras dos 82 pacientes com avaliações disponíveis e analisadas em todos os períodos de tempo; GRUPO D - amostras dos 1.321 pacientes sem avaliações disponíveis em todos os períodos de tempo.

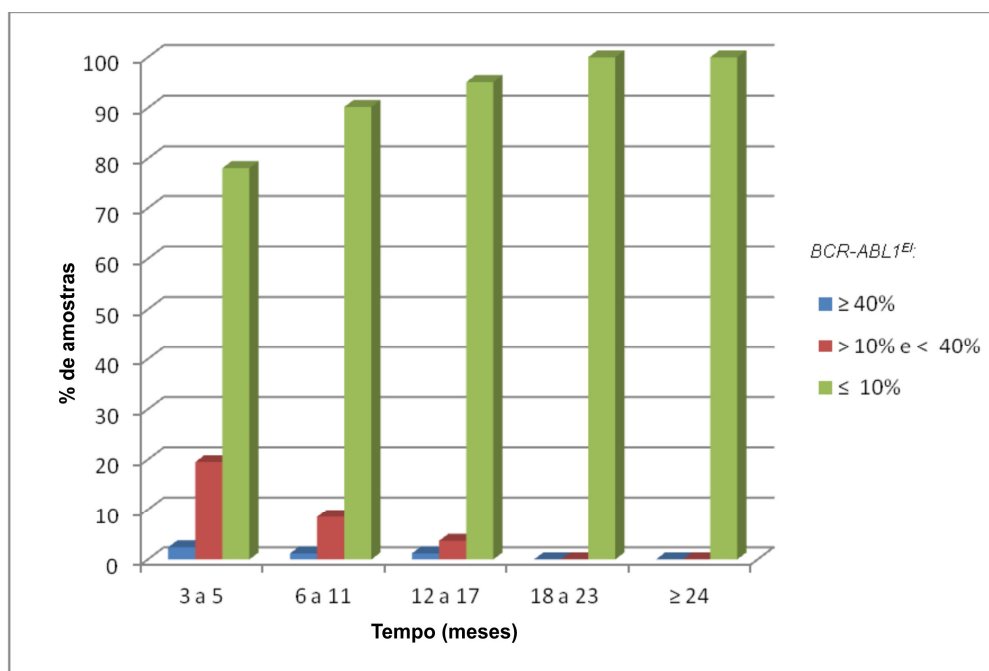


GRÁFICO 7 - PERFIL DA RESPOSTA DE 82 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI

FONTE: A autora (2014)

NOTA: Essa análise inclui somente os pacientes com amostras analisadas nos cinco períodos de tempo.

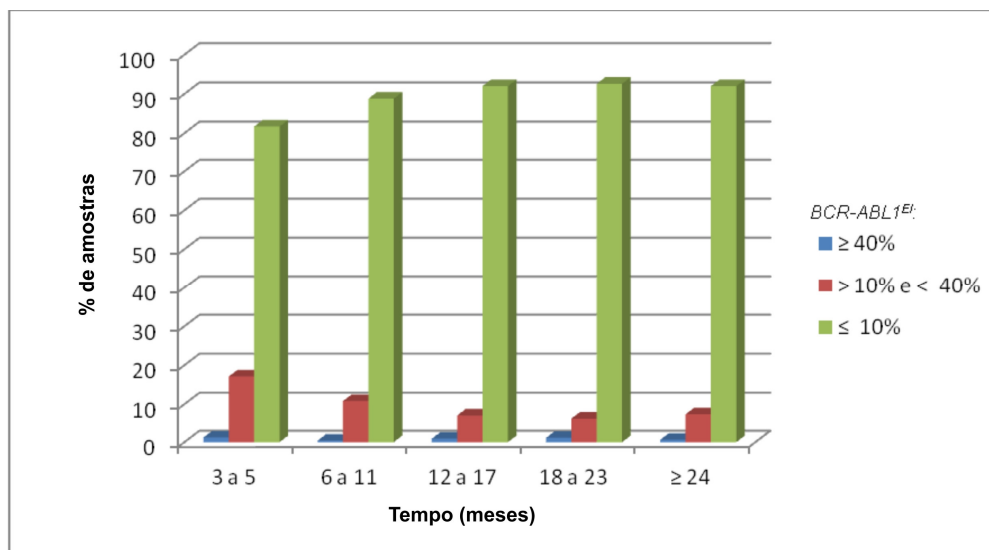


GRÁFICO 8 - PERFIL DA RESPOSTA DE 1.321 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI

FONTE: A autora (2014)

NOTA: Essa análise inclui somente os pacientes sem amostras analisadas em todos os períodos de tempo.

TABELA 10 - PERFIL DA RESPOSTA PARA OS GRUPOS C E D PARA AMOSTRAS COM QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ 

% DE TRANSCRITOS $BCR-ABL1^{EI}$	TEMPO (MESES)									
	3 a 5 meses		6 a 11 meses		12 a 17 meses		18 a 23 meses		$\geq 24$ meses	
	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D	Grupo C	Grupo D
$\leq 10\%$ e $> 1\%$	20 (24,4%)	77 (30%)	19 (23,2%)	95 (19,3%)	15 (18,3%)	77 (14,1%)	10 (12,2%)	56 (10,7%)	5 (6,1%)	110 (11,7%)
$\leq 1\%$ e $> 0,1\%$	29 (35,4%)	72 (28%)	28 (34,1%)	149 (30,3%)	26 (31,7%)	165 (30,2%)	20 (24,4%)	131 (25%)	18 (22,0%)	182 (19,4%)
$\leq 0,1\%$	15 (18,3%)	61 (23,7%)	27 (32,9%)	193 (39,2%)	37 (45,1%)	260 (47,7%)	52 (63,4%)	298 (56,9%)	59 (71,9%)	572 (60,9%)
$\leq 0,0032\%$	10 (12,2%)	28 (10,9%)	15 (18,3%)	156 (31,7%)	25 (30,5%)	195 (35,7%)	35 (42,7%)	229 (43,7%)	41 (50%)	403 (42,9%)
Não detectados	1 (1,2%)	8 (3,1%)	4 (4,9%)	26 (5,3%)	5 (6,1%)	50 (9,2%)	10 (12,2%)	48 (9,2%)	12 (14,6)	149 (15,9)
Total de amostras	82	257	82	492	82	546	82	524	82	940

FONTE: A autora (2014)

NOTA: GRUPO C - amostras dos 82 pacientes com avaliações disponíveis e analisadas em todos os períodos de tempo; GRUPO D - amostras dos 1.321 pacientes sem avaliações disponíveis em todos os períodos de tempo.

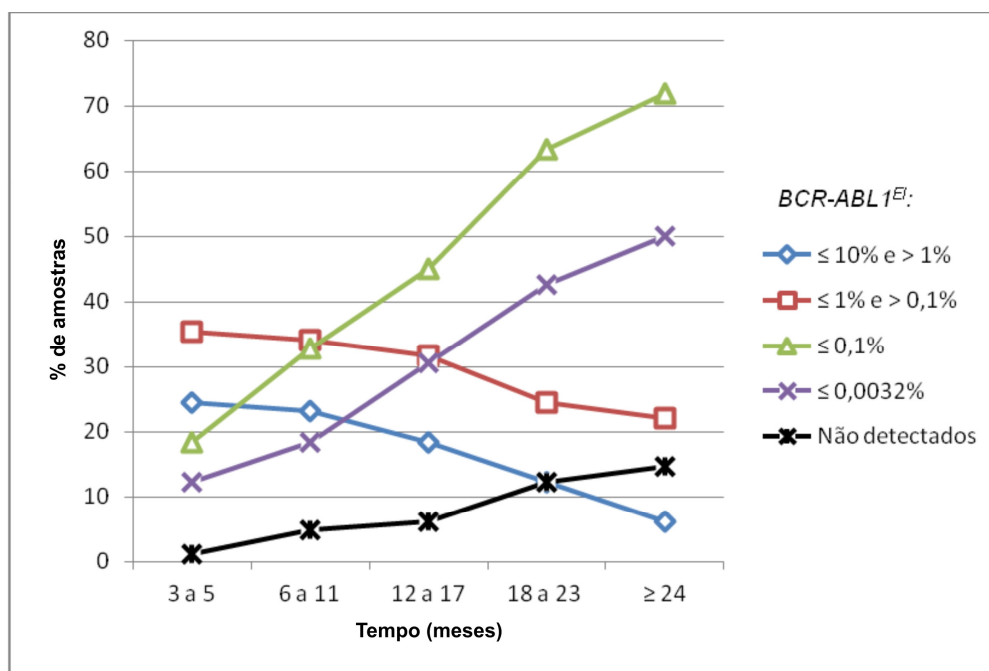


GRÁFICO 9 - PERFIL DA RESPOSTA DE 82 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$

FONTE: A autora (2014)

NOTA: Essa análise inclui somente os pacientes com amostras analisadas nos cinco períodos de tempo.

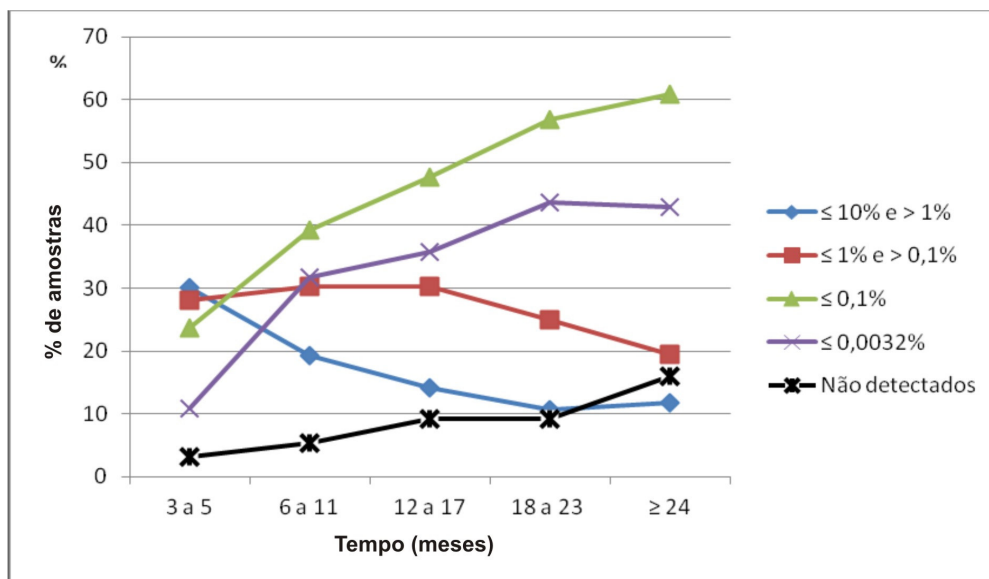


GRÁFICO 10 - PERFIL DA RESPOSTA DE 1.321 PACIENTES BRASILEIROS COM LMC-FC EM TRATAMENTO COM MI E QUANTIFICAÇÃO  $BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$

FONTE: A autora (2014)

NOTA: Essa análise inclui somente os pacientes sem amostras analisadas em todos períodos de tempo.



## 5 DISCUSSÃO

Este estudo consistiu na avaliação de 3.169 amostras, representando 1.403 pacientes brasileiros com LMC-FC em tratamento com MI 400 mg/dia, encaminhados ao Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR no período de outubro de 2002 a outubro de 2010. Esta análise retrospectiva permitiu mostrar o perfil da resposta ao tratamento com MI por meio de uma amostra representativa de pacientes brasileiros com LMC que incluiu, além dos pacientes com controle sequencial a cada três ou seis meses conforme recomendado na literatura, também aqueles com amostras analisadas em apenas alguns dos períodos de tempo estabelecidos.

Alguns aspectos, demográfico (proporção entre os sexos) e da apresentação clínica (tipo de transcrito), são semelhantes aos encontrados em outros estudos (DE LAVALLADE *et al.*, 2008; NARDINELLI, 2008; SHARMA *et al.*, 2010). A mediana de idade (46,6 anos) dos pacientes se aproxima dos valores encontrados em pesquisas de instituições internacionais (DE LAVALLADE *et al.*, 2008) e nacionais (FUNKE *et al.*, 2005; NARDINELLI, 2008; SERPA *et al.*, 2010; SILVEIRA, 2011).

Uma das dificuldades encontradas, por se tratar de um estudo retrospectivo, foi o estabelecimento dos períodos de tempo para realização da análise, em razão da heterogeneidade dos momentos de coleta das amostras que não foram programados de forma sistemática. Os períodos de tempo foram determinados procurando proximidade aos tempos de análise preconizados pelo ELN para identificação do tipo de resposta ao tratamento com MI.

Alguns pacientes apresentavam mais de uma amostra analisada no mesmo intervalo de tempo. Para esses foi selecionada apenas uma amostra por período de tempo, sendo escolhida aquela mais próxima ao início deste intervalo.

A análise do perfil da resposta molecular na amostra total amostras demonstrou que no **primeiro intervalo de tempo (três a cinco meses)**, 80,8% (274/339) dos pacientes alcançaram a redução de 1 log na quantificação dos transcritos *BCR-ABL1<sup>EI</sup>*, considerada resposta ótima ao tratamento com MI de acordo com o ELN. Este resultado foi similar ao do estudo prospectivo e randomizado de Hanfstein *et al.* (2012), que, aos três meses de tratamento, encontraram 72% dos pacientes com esse patamar e observaram que a redução precoce dos transcritos *BCR-ABL1<sup>EI</sup>* é um forte preditor da

resposta ao longo do tratamento. Esse resultado também foi observado por Marin *et al.* (2012) onde 76,0% dos pacientes haviam alcançado a quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 9,84\%$  (valor muito próximo de 10%) aos três meses de tratamento. Dentre os pacientes de nossa casuística com resposta ótima ao tratamento, 52,2% (177/339) atingiram quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI} \leq 1\%$  enquanto Hanfstein *et al.* (2012) detectaram esse nível de resposta em 31% dos pacientes aos três meses de tratamento. Também para resposta entre 1% e 10% de transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$ , nossos resultados (28,6%) diferiram dos achados por Hanfstein *et al.* (2012), que encontraram essa resposta em 41% dos pacientes analisados.

A RMM,  $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$ , foi alcançada por 22,4% (76/339) dos pacientes desta casuística e no estudo IRIS aproximadamente 15% dos pacientes estavam com este patamar de resposta aos três meses de tratamento (O'BRIEN *et al.*, 2008). Neste grupo de pacientes em RMM foi observado que 15,9% (54/339) atingiram a quantificação  $\leq 0,0032\%$  indicando uma resposta molecular profunda com redução de no mínimo 4,5 logs (RMP<sup>4,5</sup>) e, dentre estes, em 2,7% (9/339) não foram detectados transcritos  $BCR-ABL1$  pelos métodos de Q-PCR e PCR *Nested*.

Na análise do **período de tempo entre seis e 11 meses** após o início do MI, observou-se que 89% (511/574) dos pacientes alcançaram a redução de 1 log na quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$ . O estudo IRIS encontrou este patamar de resposta em 84,9% dos pacientes aos seis meses de tratamento e demonstrou que esse nível de resposta está associado com melhor sobrevida livre de eventos e sobrevida livre de progressão (HUGHES *et al.*, 2010). Em 69,1% (397/574) dos pacientes a quantificação dos transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$  foi  $\leq 1\%$ , considerada resposta ótima pelo ELN (BACCARANI *et al.*, 2013). O resultado foi similar ao de Hanfstein *et al.* (2012) e ao da atualização de sete anos do estudo IRIS (HUGHES *et al.*, 2010), onde esse nível de resposta foi observado em 63% e 67,8% dos pacientes, respectivamente.

Neste intervalo de tempo, 19,9% (114/574) dos pacientes incluem-se no grupo de sinais de alerta por apresentarem transcritos  $BCR-ABL1^{EI}$  entre 1% e 10%, e 11% (63/574) no grupo de falha ao tratamento por apresentarem transcritos  $BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ , conforme recomendações do ELN (BACCARANI *et al.*, 2013).

A RMM foi alcançada por 38,3% (220/574) dos pacientes sendo este dado similar ao do estudo IRIS que encontrou essa resposta em 33,3% dos pacientes aos seis meses de tratamento (HUGHES *et al.*, 2010). Dos pacientes em RMM, 29,8%

(171/574) alcançaram a RMP<sup>4,5</sup> e em 5,2% (30/574) destes não foram detectados transcritos *BCR-ABL1* pela Q-PCR e tampouco pela PCR *Nested*.

A monitoração dos transcritos *BCR-ABL1*<sup>El</sup> no **intervalo entre 12 e 17 meses** mostrou que 92,3% (580/628) dos pacientes alcançaram a redução de pelo menos 1 log e 77,7% (488/628) de no mínimo 2 logs nos transcritos *BCR-ABL1*<sup>El</sup>. Esses resultados foram próximos ao do estudo IRIS que encontrou 91,8% e 79,9% de pacientes com redução de 1 e de 2 logs, respectivamente (HUGHES *et al.*, 2010).

A RMM foi alcançada por 47,3% (297/628) dos pacientes, mediana de 15 meses (variação de 12 a 17 meses), os quais são considerados ótimos respondedores ao MI (BACCARANI *et al.*, 2013). Esse dado é próximo aos 50,3% encontrado na atualização do estudo IRIS (HUGHES *et al.*, 2010), enquanto 39% e 37,1% atingiram este nível de resposta nas avaliações de De Lavallade *et al.* (2008) e de Silveira (2011), respectivamente. O estudo de De Lavallade *et al.* (2008) foi prospectivo e os pacientes atingiram a RMM com mediana de 15,7 meses (2 a 73 meses). No de Silveira (2011) a RMM foi alcançada com mediana de 18 meses (6 a 78 meses), porém incluiu um número muito pequeno de pacientes com avaliação molecular (n=39).

Na casuística do presente estudo 30,4% (191/628) dos pacientes estavam no grupo de sinais de alerta (transcritos *BCR-ABL1*<sup>El</sup> > 0,1 e ≤ 1%) e 22,3% (140/628) no grupo de falha ao tratamento por apresentarem transcritos *BCR-ABL1*<sup>El</sup> > 1%.

No **intervalo entre 18 e 23 meses**, 93,6% (567/606) dos pacientes apresentaram a redução de pelo menos 1 log e 82,7% (501/606) de no mínimo 2 logs nos transcritos *BCR-ABL1*<sup>El</sup>. No estudo IRIS estes patamares de resposta foram alcançados por 93,7% e 83,8%, respectivamente (HUGHES *et al.*, 2010).

A RMM foi alcançada por 57,8% (350/606) dos pacientes incluídos no presente estudo, mediana de 19,6 meses. Hughes *et al.* (2010) encontraram 64,8% dos pacientes em RMM aos 18 meses de tratamento.

Na avaliação do **período ≥ 24 meses** após o início do tratamento com MI, a RMM foi alcançada por 61,8% (631/1.022) dos pacientes, com mediana de 35 meses, e a RMP<sup>4,5</sup> por 43,4% (444/1.022). Foi observado que 38,2% (391/1.022) dos pacientes sem atingir a RMM após 24 meses ainda continuavam em tratamento com MI. Uma possível causa é a dificuldade de acesso ao exame de quantificação dos transcritos do gene *BCR-ABL1* pelos pacientes atendidos em centros distantes dos

laboratórios especializados. Muitos pacientes tiveram a primeira monitoração nos níveis de transcritos *BCR-ABL1* realizada apenas após 18 meses do uso do MI.

Essa situação de continuidade do uso do medicamento sem que o patamar de resposta adequado tivesse sido alcançado também pode refletir o uso inadequado do medicamento devido aos efeitos adversos ou simplesmente pela falta de adesão ou, ainda, ser ocasionada por resistência secundária ao medicamento. Pode também ser decorrente da dificuldade em nosso país de acesso a outro tipo de tratamento, tais como os inibidores da tirosina quinase de segunda geração e o transplante de células tronco-hematopoéticas.

As variações nos resultados de resposta ao tratamento com MI entre este e outros estudos podem refletir diferenças entre as metodologias utilizadas. Enquanto o estudo IRIS é prospectivo e randomizado e inclui pacientes que receberam imatinibe como primeira linha de tratamento, o presente estudo é retrospectivo e não teve informação disponível sobre tratamentos prévios. Bendit *et al.* (2012) mostraram que o número de pacientes brasileiros que alcançaram a RMM foi significativamente maior nos que utilizaram imatinibe como primeira linha de tratamento quando comparados aos que receberam INF- $\alpha$  mais ARA-C anteriormente ao MI.

Quando as amostras foram divididas em dois grupos (grupo A com as amostras oriundas de cinco instituições e grupo B com as amostras provenientes de 21 instituições) e avaliadas quanto ao perfil de resposta, constatou-se um favorecimento da resposta em prol das amostras presentes no grupo A. Entretanto, é difícil estimar o valor destas diferenças por se tratar de um estudo retrospectivo no qual a maioria dos pacientes não apresentaram amostras avaliadas em todos os períodos de tempo.

O perfil da resposta molecular entre os 82 pacientes (grupo C) que apresentavam amostras analisadas em todos os períodos de tempo foi concordante até o intervalo entre 12 e 17 meses com o perfil dos 1.321 pacientes (grupo D) que não apresentavam avaliações sequenciais. Nos dois últimos intervalos, as respostas foram melhores no grupo de 82 pacientes onde todos atingiram a redução de 1 log a partir do período de 18 a 23 meses de uso do MI. Isto reafirma a importância do acompanhamento sequencial, a cada três ou seis meses, para que o manejo clínico possa ocorrer precocemente quando o paciente não apresenta resposta adequada

ao medicamento. A RMM foi alcançada por 47,7% (mediana de 15,9 meses) dentre os 1.321 pacientes e por 45,1% (mediana de 14,2 meses) entre os 82 pacientes.

Os dados deste estudo retrospectivo fornecem uma visão geral do perfil da resposta molecular nos pacientes brasileiros portadores de LMC-FC em tratamento com MI 400 mg/dia. A observação de que a monitoração sequencial dos pacientes é imprescindível para o adequado manejo clínico enfatiza a importância da inclusão deste tipo de exame laboratorial no Sistema Único de Saúde. Isto assegurará a todos os pacientes com LMC em tratamento com MI a correta monitoração da resposta ao uso do imatinibe e a possibilidade de emprego de outras estratégias terapêuticas em tempo hábil quando pertinente.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo retrospectivo em amostras encaminhadas para análise quantitativa dos transcritos *BCR-ABL1* mostram que:

- A resposta molecular maior foi alcançada por praticamente metade (47,3%) dos pacientes no intervalo entre 12 e 17 meses. Isto sugere que o perfil da resposta em pacientes brasileiros portadores de LMC-FC, em tratamento com IM 400 mg/dia, encontra-se próximo ao esperado quando comparado ao perfil da resposta dos pacientes reportados em estudos internacionais prospectivos e randomizados.
- O perfil da resposta nos pacientes com amostras avaliadas consecutivamente em todos os intervalos de tempo foi superior, a partir dos 18 meses do uso do IM, ao encontrado entre os pacientes que não apresentaram avaliações sequenciais.

## REFERÊNCIAS

AHMED, W.; VAN ETEN, R. Signal transduction in the chronic leukemias: implications for targeted therapies. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v.8, n.1, p.71-80, 2013.

AICHBERGER, K. J.; MAYERHOFER, M.; KRAUTH, M. T.; SKVARA, H.; FLORIAN, S.; SONNECK, K.; AKGUL, C.; DERDAK, S.; PICKL, W. F.; WACHECK, V.; SELZER, E.; MONIA, B. P.; MORIGGL, R.; VALENT, P.; SILLABER, C. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. **Blood**, v.105, n.8, p.3302-3311, 2005.

APPERLEY, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncology**, v.8, n.11, p.1018-1029, 2007.

BACCARANI, M.; SAGLIO, G.; GOLDMAN, J.; HOCHHAUS, A.; SIMONSSON, B.; APPELBAUM, F.; APPERLEY, J.; CERVANTES, F.; CORTES, J.; DEININGER, M.; GRATWOHL, A.; GUILHOT, F.; HOROWITZ, M.; HUGHES, T.; KANTARJIAN, H.; LARSON, R.; NIEDERWIESER, D.; SILVER, R.; HEHLMANN, R.; EUROPEAN LEUKEMIANET. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v.108, n.6, p.1809-1820, 2006.

BACCARANI, M.; CASTAGNETTI, F.; GUGLIOTTA, G.; PALANDRI, F.; SOVERINI, S.; EUROPEAN LEUKEMIA NET. Response definitions and European LeukemiaNet Management recommendations. Best practice & research. Clinical Haematology, v.22, n.3, p.331-341, 2009.

BACCARANI, M.; DEININGER, M. W.; ROSTI, G.; HOCHHAUS, A.; SOVERINI, S.; APPERLEY, J. F.; CERVANTES, F.; CLARK, R. E.; CORTES, J. E.; GUILHOT, F.; HJORTH-HANSEN, H.; HUGHES, T. P.; KANTARJIAN, H. M.; KIM, D. W.; LARSON, R. A.; LIPTON, J. H.; MAHON, F. X.; MARTINELLI, G.; MAYER, J.; MÜLLER, M. C.; NIEDERWIESER, D.; PANE, F.; RADICH, J. P.; ROUSSELOT, P.; SAGLIO, G.; SAUËLE, S.; SCHIFFER, C.; SILVER, R.; SIMONSSON, B.; STEEGMANN, J. L.; GOLDMAN, J. M.; HEHLMANN, R. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v.122, n.6, p.872-884, 2013.

BENDIT, I.; SANABANI, S. S.; CONCHON, M.; SERPA, M.; NOVAES, M. M.; NARDINELLI, L.; PEREIRA, T. D.; TUCUNDUVA L.; FERREIRA, P. de B.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; FISCHER CHAMONE, D. de A. Evaluation of long-term outcomes, cytogenetic and molecular responses with imatinibmesylate in early and late chronic-phase chronic myeloid leukemia: a report from a single institute. **Acta Haematologica**, v.128, n.4, p.223-232, 2012.

BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Leucemia Mieloide Crônica: história natural e classificação. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30, p.3-7, 2008.

BRANDFORD, S.; HUGHES, T. P.; RUDZKI, Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. **British Journal of Haematology**, v.107, n.3, p.587-599, 1999.

BRANDFORD, S.; FLETCHER, L.; CROSS, N. C.; MÜLLER, M. C.; HOCHHAUS, A.; KIM, D. W.; RADICH, J. P.; SAGLIO, G.; PANE, F.; KAMEL-REID, S.; WANG, Y. L.; PRESS, R. D.; LYNCH, K.; RUDZKI, Z.; GOLDMAN, J. M.; HUGHES, T. Desirable performance characteristics for *BCR-ABL* measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison on response rates between clinical trials. **Blood**, v.112, n.8, p.3330-3338, 2008.

BRASIL. Portaria n.º 347, de 23 de junho de 2008. Altera o item 4 da portaria SAS/MS n.º 431, de 3 de outubro de 2001, conforme anexo desta portaria. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 jun. 2008. Seção I, p.54, c I.

CALABRETTA, B.; PERROTTI, D. The biology of CML blast crisis. **Blood**, v.103, n.11, p.4010-4022, 2004.

CHEN, Y.; PENG, C.; LI, D.; LI, S. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia. **Protein Cell**, v.1, n.2, p.124-132, 2010.

CHUANG, L. S. H.; ITO, K.; ITO, Y. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. **International Journal of Cancer**, v.132, n.6, p.1260-1271, 2013.

CILLONI, D.; SAGLIO, G. Molecular pathways: BCR-ABL. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v.18, n.4, p.930-937, 2012.



CORTES, J.; KANTARJIAN, H. How I treat newly diagnosed chronic phase CML. **Blood**, v.120, n.7, p.1390-1397, 2012.

CROSS, N. C. P.; HUGHES, T. P.; FENG, L.; O'SHEA, P.; BUNGEY, J.; MARKS, D. I.; FERRANT, A.; MARTIAT, P.; GOLDMAN, J. M. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versushost disease and relapse. **British Journal of Haematology**, v.84, n.1, p.67-74, 1993a.

CROSS, N. C.; FENG, L.; CHASE, A.; BUNGEY, J.; HUGHES, T. P.; GOLDMAN, J. M. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. **Blood**, v.82, n.6, p.1929-1936, 1993b.

CROSS, N. C. P.; MELO, J. V.; FENG, L.; GOLDMAN, J. M. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. **Leukemia**, v.8, n.1, p.186-189, 1994.

CROSS, N. C. P.; WHITE, H. E.; MÜLLER, M. C.; SAGLIO, G.; HOCHHAUS, A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v.26, n.10, p.2172-2175, 2012.

DANCE, M.; MONTAGNER, A.; SALLES, J. P.; YART, A.; RAYNAL, P. The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. **Cellular Signalling**, v.20, n.3, p.453-459, 2008.

DAVIS, K. L. Ikaros: master of hematopoiesis, agent of leukemia. **Therapeutic Advances in Hematology**, v.2, n.6, p.359-368, 2011.

DE LAVALLADE, H.; APPERLEY, J. F.; KHORASHAD, J. S.; MILOJKOVIC, D.; REID, A. G.; BUA, M.; SZYDLO, R.; OLAVARRIA, E.; KAEDA, J.; GOLDMAN, J. M.; MARIN, D. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, n.20, p.3358-3363, 2008.

DEININGER, M. W. N. Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib. **The Education Program of the American Society of Hematology**, p.419-26, 2008.

DEININGER, M. W. N.; DRUKER, B. J. Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib. **Pharmacologic Reviews**, v.55, n.3, p.401-423, 2003.

DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.96, n.10, p.3343-3356, 2000.

DRUKER, B. J.; GUILHOT, F.; O'BRIEN, S. G.; GATHMANN, I.; KANTARJIAN, H.; GATTERMANN, N.; DEININGER, M. W.; SILVER, R. T.; GOLDMAN, J. M.; STONE, R. M.; CERVANTES, F.; HOCHHAUS, A.; POWELL, B. L.; GABRILOVE, J. L.; ROUSSELOT, P.; REIFFERS, J.; CORNELISSEN, J. J.; HUGHES, T.; AGIS, H.; FISCHER, T.; VERHOEF, G.; SHEPHERD, J.; SAGLIO, G.; GRATWOHL, A.; NIELSEN, J. L.; RADICH, J. P.; SIMONSSON, B.; TAYLOR, K.; BACCARANI, M.; SO, C.; LETVAK, L.; LARSON, R. A.; IRIS INVESTIGATORS. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.355, n.23, p.2408-17, 2006.

FADERL, M.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H. M. The biology of chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.341, n.2, p.164-172, 1999.

FUNKE, V. A. M.; MEDEIRO, C. R.; LIMA, D. H.; SETÚBAL, D. C.; BITENCOURT, M. A.; BONFIM, C. M.; RUIZ, J.; ZANIS NETO, J.; PASQUINI, R. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinibmesylate in Brazil: a study of 98 cases. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.27, n.3, p.159-165, 2005.

FUNKE, V. A. M.; PASQUINI, R. Leucemia Mieloide Crônica. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013.

GEARY, C. G. The story of chronic myeloid leukemia. **British Journal of Haematology**, v.110, n.1, p.2-11, 2000.

GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.344, n.14, p.1084-1086, 2001.

GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. **The New England Journal of Medicine**, v.349, n.15, p.1451-1464, 2003.

HANFSTEIN, B.; MÜLLER, M. C.; HEHLMANN, R.; ERBEN, P.; LAUSEKER, M.; FABARIUS, A.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, C.; GÖHRING, G.; PROETEL, U.; KOLB, H. J.; KRAUSE, S. W.; HOFMANN, W. K.; SCHUBERT, J.; EINSELE, H.; DENGLER, J.; HÄNEL, M.; FALGE, C.; KANZ, L.; NEUBAUER, A.; KNEBA, M.; STEGELMANN, F.; PFREUNDSCHUH, M.; WALLER, C. F.; BRANFORD, S.; HUGHES, T. P.; SPIEKERMANN, K.; BAERLOCHER, G. M.; PFIRRMANN, M.; HASFORD, J.; SAUBELE, S.; HOCHHAUS, A.; SAKK; GERMAN CML STUDY GROUP. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). **Leukemia**, v.26, n.9, p.2096-2102, 2012.

HANFSTEIN, B.; LAUSEKER, M.; HEHLMANN, R.; SAUSSELE, S.; ERBEN, P.; DIETZ, C.; FABARIUS, A.; PROETEL, U.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, C.; KRAUSE, S. W.; SCHUBERT, J.; EINSELE, H.; HÄNEL, M.; DENGLER, J.; FALGE, C.; KANZ, L.; NEUBAUER, A.; KNEBA, M.; STEGELMANN, F.; PFREUNDSCHUH, M.; WALLER, C. F.; SPIEKERMANN, K.; BAERLOCHER, G. M.; PFIRRMANN, M.; HASFORD, J.; HOFMANN, W. K.; HOCHHAUS, A.; MÜLLER, M. C. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. **Haematologica**, 2014 (Epub ahead of print).

HASFORD, J.; ALLAN, N. C.; JOHANNA, C. A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon Alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, n.11, 1998.

HASFORD, J.; BACCARANI, M.; HOFFMANN, V.; GUILHOT, J.; SAUSSELE, S.; ROSTI, G.; GUILHOT, F.; PORKKA, K.; OSSENKOPPELE, G.; LINDOERFER, D.; SIMONSSON, B.; PFIRRMANN, M.; HEHLMANN, R. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. **Blood**, v.118, n.3, p.686-92, 2011.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. On behalf of the European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v.370, p.342-350, 2007.

HUGHES, T. P.; KAEDA, J.; BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; HOCHHAUS, A.; HENSLEY, M. L.; GATHMANN, I.; BOLTON, A. E.; VAN HOOMISSEN, I. C.; GOLDMAN, J. M.; RADICH, J. P.; INTERNATIONAL RANDOMISED STUDY OF INTERFERON VERSUS STI571 (IRIS) STUDY GROUP. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.349, n.15, p.1423-1432, 2003.

HUGHES, T.; DEININGER, M.; HOCHHAUS, A.; BRANFORD, S.; RADICH, J.; KAEDA, J.; BACCARANI, M.; CORTES, J.; CROSS, N. C.; DRUKER, B. J.; GABERT, J.; GRIMWADE, D.; HEHLMANN, R.; KAMEL-REID, S.; LIPTON, J. H.; LONGTINE, J.; MARTINELLI, G.; SAGLIO, G.; SOVERINI, S.; STOCK, W.; GOLDMAN, J. M. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. **Blood**, v.108, p.28-37, 2006.

HUGHES, T. P.; HOCHHAUS, A.; BRANFORD, S.; MÜLLER, M. C.; KAEDA, J. S.; FORONI, L.; DRUKER, B. J.; GUILHOT, F.; LARSON, R. A.; O'BRIEN, S. G.; RUDOLTZ, M. S.; MONE, M.; WEHRLE, E.; MODUR, V.; GOLDMAN, J. M.; RADICH, J. P.; IRIS INVESTIGATORS. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). **Blood**, v.116, n.19, p.3758-3765, 2010.

HUGHES, T.; BRANFORD, S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. **Blood reviews**, v.20, n.1, p.29-41, 2006.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. **American Journal of Hematology**, v.87, n.11, p.1037-1045, 2012.

JAGANI, Z.; DORSCH, M.; WARMUTH, M. Hedgehog pathway activation in chronic Myeloid Leukemia: A promise for a novel combination therapeutic approach?. **Cell Cycle**, v.9, n.17, p.3449-3456, 2010.

LAURENT, E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H.; KURZROCK, R. The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. **Cancer Research**, v.61, n.6, p.2343-2355, 2001.

LEITNER, A. A.; HOCHHAUS, A.; MÜLLER, M. C. Current Treatment Concepts of CML. **Current Cancer Drug Targets**, v.11, n.1, p.31-43, 2011.

LEMOES, J. A. R. de; DE OLIVEIRA, C. M.; SCERNI, A. C.; BENTES, A. Q.; BELTRÃO, A. C.; BENTES, I. R.; AZEVEDO, T. C.; MARADEI-PEREIRA, L. M. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.4, p.803-811, 2005.

LUCAS, C. M.; HARRIS, R. J.; GIANNOUDIS, A.; DAVIES, A.; KNIGHT, K.; WATMOUGH, S. J.; WANG, L.; CLARK, R. E. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. **Haematologica**, v.94, n.10, p.1362-1367, 2009.

MACHADO, M. P.; TOMAZ, J. P.; LORAND-METZE, I.; DE SOUZA, C. A.; VIGORITO, A. C.; DELAMAIN, M. T.; BENDIT, I.; PEREIRA, N. F.; PAGNANO, K. B. Monitoring of BCR-ABL levels in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib in the chronic phase – the importance of a major molecular response. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.33, n.3, p.211-215, 2011.

MARIN, D.; KAEDA, J.; SZYDLO, R.; SAUNDERS, S.; FLEMING, A.; HOWARD, J.; ANDREASSON, C.; BUA, M.; OLAVARRIA, E.; RAHEMTULLA, A.; DAZZI, F.; KANFER, E.; GOLDMAN, J. M.; APPERLEY, J. F. Monitoring patients in complete cytogenetic remission after treatment of CML in chronic phase with imatinib: patterns of residual leukaemia and prognostic factors for cytogenetic relapse. **Leukemia**, v.19, n.4, p.507-512, 2005.

MARIN, D.; IBRAHIM, A. R.; LUCAS, C.; GERRARD, G.; WANG, L.; SZYDLO, R. M.; CLARK, R. E.; APPERLEY, J. F.; MILOJKOVIC, D.; BUA, M.; PAVLU, J.; PALIOMPEIS, C.; REID, A.; REZVANI, K.; GOLDMAN, J. M.; FORONI, L. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. **Journal of Clinical Oncology**, v.30, n.3, p.232-238, 2012.

MAURO, M. J.; DRUKER, B. J. STI571: Targeting BCR-ABL as Therapy for CML. **The Oncologist**, v.6, n.3, p.233-238, 2001.

MELO, J. V.; GORDON, D. E.; CROSS, N. C.; GOLDMAN, J. M. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.81, n.1, p.158-165, 1993.

MELO, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **Blood**, v.88, n.7, p.2375-2384, 1996.

MELO, J. V.; DEININGER, M. W. N. Biology of chronic myelogenous leukemia – signaling pathways of initiation and transformation. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.18, n.3, p.545-568, 2004.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n.6, p.441-453, 2007.

MÜLLER, M. C.; CROSS, N. C.; ERBEN, P.; SCHENK, T.; HANFSTEIN, B.; ERNST, T.; HEHLMANN, R.; BRANFORD, S.; SAGLIO, G.; HOCHHAUS, A. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. **Leukemia**, v.23, n.11, p.1957-1963, 2009.

NAGAR, B.; BORNMANN, W. G.; PELLICENA, P.; SCHINDLER, T.; VEACH, D. R.; MILLER, W. T.; CLARKSON, B.; KURIYAN, J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). **Cancer Research**, v.62, n.15, p.4236-4243, 2002.

NAIR, R. R.; TOLENTINO, J. H.; HAZLEHURST, L. Role of STAT3 in Transformation and Drug Resistance in CML. **Frontiers in oncology**, v.2, n.April, p.30, 2012.

NARDI, V.; AZAM, M.; DALEY, G. Q. Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. **Current Opinion in Hematology**, v.11, p.35-43, 2003.

NARDINELLI, L. **Acompanhamento de pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com mesilato de imatinibe e avaliação dos mecanismos de resistência ao tratamento**: mutação do gene BCR-ABL e expressão dos genes MDR1 e BCRP. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v.142, p.1497, 1960.

O'BRIEN, S. G.; GUILHOT, F.; LARSON, R. A.; GATHMANN, I.; BACCARANI, M.; CERVANTES, F.; CORNELISSEN, J. J.; FISCHER, T.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T.; LECHNER, K.; NIELSEN, J. L.; ROUSSELOT, P.; REIFFERS, J.; SAGLIO, G.; SHEPHERD, J.; SIMONSSON, B.; GRATWOHL, A.; GOLDMAN, J. M.; KANTARJIAN, H.; TAYLOR, K.; VERHOEF, G.; BOLTON, A. E.; CAPDEVILLE, R.; DRUKER, B. J.; IRIS INVESTIGATORS. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.348, n.11, p.994-1004, 2003.

O'BRIEN, S. G. *et al.* On behalf of the IRIS investigators. IRIS 7-years update. **Blood** (ASH Meeting Abstracts), v.112, n.11, Abstract 186, 2008.

PASSEGUÉ, E.; JAMIESON, C. H.; AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, Suppl 1, p.11842-11849, 2003.

PERROTTI, D.; JAMIESON, C.; GOLDMAN, J.; SKORSKI, T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. **Science in Medicine**, v.120, n.7, p.2254-2264, 2010.

PIERRE, S.; BATS, A.; COUMOUL, X. Understanding SOS (Son of Sevenless). **Biochemical Pharmacology**, v.82, n.9, p.1049-1056, 2011.

PRIETO-ECHAGÜE, V.; MILLER, W. T. Regulation of ack-family nonreceptor tyrosine kinases. **Journal of Signal Transduction**, v.2011, p.742372, 2011.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Molecular biology of BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.113, p.1619-1630, 2009.

RADICH, J. P. The Biology of CML blast crisis. **The Education Program of the American Society of Hematology**, CML, p.384-391, 2007.

REILLY, J. T. Chronic neutrophilic leukaemia: a distinct clinical entity?. **British Journal of Haematology**, v.116, n.1, p.10-18, 2002.

SACHS, R. K.; JOHNSON, K.; HAHNFELDT, P.; LUO, J.; CHEN, A.; HLATKY, L. A multicellular basis for the origination of blast crisis in chronic myeloid leukemia. **Cancer Research**, v.71, n.8, p.2838-2847, 2011.

SAWYERS, C. I. Chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.340, n.17, p.1330-1340, 1999.

SERPA, M.; SANABANI, S. S.; DORLIAC-LLACER, P. E.; CONCHON, M.; PEREIRA, T. D.; NARDINELLI, L.; COSTA, J. L.; NOVAES, M. M.; FERREIRA, P. de B.; BENDIT, I. Molecular measurement of BCR-ABL transcript variations in chronic myeloid leukemia patients in cytogenetic remission. **BMC Blood Disorders**, v.10, p.7, 2010.

SHARMA, P.; KUMAR, L.; MOHANTY, S.; KOCHUPILLAI, V. Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. **Annals of Hematology**, v.89, n.3, p.241-247, 2010.

SILVEIRA, C. A. **Resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe nos portadores de leucemia mieloide crônica do Hospital de Base do Distrito Federal**. 98f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2011.

SMITH, K. M.; YACOBI, R.; VAN ETEN, R. A. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. **Molecular Cell**, v.12, n.1, p.27-37, 2003.

SOKAL, J. E.; COX, E. B.; BACCARANI, M.; TURA, S.; GOMEZ, G. A.; ROBERTSON, J. E.; TSO, C. Y.; BRAUN, T. J.; CLARKSON, B. D.; CERVANTES, F.; *et al.* Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v.63, n.4, p.789-99, 1984.

SOUZA, C. A. de; PAGNANO, K. B.; BENDIT, I.; CONCHON, M.; FREITAS, C. M.; COELHO, A. M.; FUNKE, V. A. M.; BERNARDO, W. M. Chronic myeloid leukemia treatment guidelines: Brazilian Association of Hematology, Hemotherapy and Cell Therapy. Brazilian Medical Association Guidelines Project – 2012. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.34, n.5, p.367-382, 2012.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC, 2008.

VAKANA, E.; PLATANIAS, L. C. AMPK in BCR-ABL expressing leukemias. Regulatory effects and therapeutic implications. **Oncotarget**, v.2, n.12, p.1322-1328, 2011. -

WEI, F.; YAN, J.; TANG, D. Extracellular signal-regulated kinases modulate DNA damage response – a contributing factor to using MEK inhibitors in cancer therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, n.35, p.5476-5482, 2011.

WHITE, H. E.; MATEJTSCHUK, P.; RIGSBY, P.; GABERT, J.; LIN, F.; LYNN WANG, Y.; BRANFORD, S.; MÜLLER, M. C.; BEAUFILS, N.; BEILLARD, E.; COLOMER, D.; DVORAKOVA, D.; EHRENCRONA, H.; GOH, H. G.; EL HOUSNI, H.; JONES, D.; KAIRISTO, V.; KAMEL-REID, S.; KIM, D. W.; LANGABEER, S.; MA, E. S.; PRESS, R. D.; ROMEO, G.; WANG, L.; ZOI, K.; HUGHES, T.; SAGLIO, G.; HOCHHAUS, A.; GOLDMAN, J. M.; METCALFE, P.; CROSS, N. C. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantification of BCR-ABL mRNA. **Blood**, v.116, v.22, p.111-117, 2010.

WHITE, H. E.; HEDGES, J.; BENDIT, I.; BRANFORD, S.; COLOMER, D.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T.; KAMEL-REID, S.; KIM, D. W.; MODUR, V.; MÜLLER, M. C.; PAGNANO, K. B.; PANE, F.; RADICH, J.; CROSS, N. C.; LABOURIER, E. Establishment and validation of analytical reference panels for the standardization of quantitative BCR-ABL1 measurements on the international scale. **Clinical Chemistry**, v.59, v.6, p.938-948, 2013.



**ANEXO 1**  
**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



2ª Via



Curitiba, 27 de setembro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Ana Lucia Vieira Mion**  
**Hospital de Clínicas da UFPR**  
Curitiba - PR

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: “**PERFIL DA RESPOSTA MOLECULAR NA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA (LMC) EM TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE (MI)**”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de setembro de 2011.

O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e suas complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

**CAAE: 0229.0.208.000-11**  
**Registro CEP: 2610.217/2011-09**

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do primeiro relatório: março de 2012.**

Atenciosamente,

**Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR